

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
Departamento de Psicología Experimental, Procesos Cognitivos y
Logopedia



TESIS DOCTORAL

**Características cognitivas y neurofisiológicas en ancianos
sanos con factores de riesgo genético de Enfermedad de
Alzheimer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Inmaculada Concepción Rodríguez Rojo

Director

Fernando Maestú Unturbe

Madrid
Ed. electrónica 2019

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Psicología

Departamento de Psicología Experimental, Procesos Cognitivos y
Logopedia



Tesis Doctoral

Características cognitivas y neurofisiológicas en ancianos sanos
con factores de riesgo genético de Enfermedad de Alzheimer.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Inmaculada Concepción Rodríguez Rojo

Director

Fernando Maestú Unturbe

Madrid, 2018

“Te escribo ahora, mientras duermes, por si mañana ya no fuera yo el que amanece a tu lado. (...) Por si mañana ya no pudiera darte las gracias. Por si mañana, Julia, no fuera capaz de decirte, aunque sea una última vez, que te quiero.”

Autor: Jesús Espada, periodista de radio Castilla-La Mancha y ganador del primer premio del III Concurso de Cartas de Amor celebrado en 2014 en Cobisa (Toledo).

Dedicado a todos los enfermos de Alzheimer y a sus familias

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de este trabajo de investigación. Tanto a los profesionales encargados de realizar cada una de las pruebas necesarias para la consecución del estudio, como a los propios participantes. Sin vuestra ayuda no hubiera sido posible. Gracias a Queti por su dedicación e inestimable ayuda en todos los trámites administrativos durante todo este periodo.

Muchas gracias a Fernando por confiar en mí desde el principio, por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio, por estar siempre a nuestra disposición cada vez que lo hemos necesitado, y, sobre todo, por ser un ejemplo de humildad para todos los que le rodean y transmitir como nadie ese entusiasmo y pasión por todo lo que hace. Gracias también a Alberto y a María Eugenia por su guía, ayuda, escucha y consejo siempre que lo he necesitado.

Muchas gracias a mis compañeros de laboratorio y de proyecto. Muchos de vosotros compañeros de batalla y amigos. Todos y cada uno de vosotros habéis contribuido con vuestro granito de arena a que esta tesis haya visto la luz. Gracias por los ánimos, los consejos, los momentos compartidos, las clases magistrales en las que tras un mes intentando entender algo, solo bastaban 5 minutos de vuestro tiempo para llegar a comprenderlo (ojalá os hubiese preguntado más), los viajes que nos devolvieron algún rap que otro, los que nos sirvieron para ver si eso de las puntuaciones de riesgo genético se podría materializar en algún momento o aquellos otros en los que por despiste (esperemos que no fuera un síntoma precoz de Alzheimer), una servidora se fuera casi hasta la sierra de Guadarrama el día de su cumpleaños. Gracias por aceptarme como soy (con mis virtudes y mis defectos) y por estar siempre dispuestos a ayudarme. Podría ir dando las gracias uno por uno y quizás más que llamarse agradecimientos, debería pasar a formar parte de un capítulo de la tesis. Los que me conocéis bien, sabéis lo que me gusta extenderme, así que como a muchos de vosotros ya os he ido dando las gracias personalmente no solo en una, sino en varias ocasiones (también sabéis que soy muy cansina), creo que podréis disculparme (por esta vez) y que me permitáis ahorrarme unas cuantas páginas de redacción extra. Intentaré compensaros con un rap personalizado si después de la defensa de la tesis me quedan neuronas disponibles para

ello. En cualquier caso, no puedo dejar de dar las gracias una vez más a Pablo. No tengo palabras para expresar todo tu apoyo durante estos años (y quizás te haya caído la cruz de tener que soportar al menos durante una larga temporada un mensaje o e-mail quincenal en el que no falte un “gracias por todo” a modo de recordatorio), pero es que la mitad de esta tesis es tuya además de haberme demostrado que las buenas personas existen y que he tenido la suerte de encontrarme con una de ellas por el camino.

También quiero dar las gracias al equipo “binge” (Ángeles, María y Laura). Parte de esta andadura predoctoral la comencé junto a vosotras y, aunque la tesis finalmente no tenga mucho que ver con ello, vuestro rigor e ilusión en el trabajo me han servido de guía y ejemplo durante todo este tiempo. Solo puedo deciros que da gusto trabajar con vosotras y que ojalá podamos hacer muchas más cosas en el futuro.

Muchas gracias a mis pequeñajas, Vero y Cris, por dejaros querer y porque con vuestra alegría y vuestras ganas de aprender hacíais que los registros de fibromialgia fueran muy divertidos. Gracias a Ceferino por sus ganas de enseñar y también a Chema, cuya dedicación para con los pacientes y el esfuerzo (a veces inhumano) para llegar a tiempo a los registros a pesar de no haber dormido lo suficiente por causa de alguna que otra guardia, hace que no solo te admire, sino que irremediablemente recuerde con cariño y nostalgia aquella época en la que yo también me dedicaba a cuidar de los demás.

Gracias a Ana, compañera de máster y amiga. Por todos los momentos compartidos durante los registros de alcohol en la MEG, fuera de la MEG y sobre todo por esos audios inacabables en esta última etapa en la que nos hemos apoyado mutuamente para no desfallecer. Te deseo todo lo mejor, hoy y siempre.

Gracias también a Ramón y a Jose, porque desde que comenzamos a trabajar juntos no he dejado de aprender de vosotros. Jose, tú además has sido mi instructor durante mi etapa de formación docente. Ya sabes que te estoy enormemente agradecida por todas las facilidades que me has dado y sobre todo por todos los buenos consejos que has sabido brindarme en el momento oportuno.

Muchas gracias a Miguel por su profesionalidad y cercanía, por acogernos a Jais y a mí en su laboratorio y por darnos la oportunidad de aprender un poquito más de este fascinante mundo que es la genética. Especialmente muchas gracias a Juani por su

infinita paciencia cuando las cosas no nos salían muy bien y también a Carmen, Herminia, Olga y María Jesús por tener siempre una sonrisa para nosotras y estar dispuestas a ayudar en todo momento.

No me puedo olvidar de mis compañeros “unedianos”. Muchas gracias a Loli por ser como una hermana para mí desde el momento en que te conocí. Eres un ejemplo de optimismo y lucha constante. Espero que podamos seguir compartiendo muchos momentos especiales juntas. También a Pedro y a Javier (en parte sois los responsables de que el gusanillo de la investigación despertara en mí). Sabéis que siempre os estaré agradecida por vuestro apoyo en los inicios.

Thank you very much Michael (Dr. Funke) and Gretchen (Dr. Von Allmen) for your hospitality and for the generous welcome you gave me during my stay in Houston. You and your team are highly-motivated professionals, with excellent training, but, above all, you are wonderful people with a great heart. I admire you and I will always remember the contagious laugh of Ardonia, the excellent VIP tour to the NASA and our dinners and conversations about globalization with a good glass of wine. Aquí tenéis vuestra casa para lo que necesitéis. ¡La próxima vez que vengáis tenemos que ir a Galicia!

A todas aquellas personas que de algún modo han marcado mi vida a nivel académico y profesional. Empezando por Sor Dorotea y Sor Carmen en parvulitos hasta D. Antonio Chaves, Luisa Vélez, Almudena, Jose, D. Antonio Ramírez, Charo, Gema Barajas, D. Francisco, Tere, Kiko, D. Vicente, Jesús Anero, y los hermanos Antonio, Leoncio, Ángel y Jose Vicente durante mis años en La Salle. También recuerdo con cariño a algunos profesores del instituto como a Pedro, Irene, Rosa o Virgilio, pero especialmente a Vicky, por esa visita inesperada que jamás olvidaré. A mis profesores de Enfermería, Blanca Escobar, Mari Paz Mompart y Jose Antonio de la Torre. Vosotros sois la causa por la que decidí continuar con la carrera de Psicología una vez acabé la diplomatura. A mis profesores de prácticas, especialmente a mi querido amigo Juan, gracias por enseñarme tanto y sobre todo por confiar en mí y darme la seguridad que necesitaba y que me hizo crecer como profesional y como persona. Siempre te llevaré en el corazón. También quiero dar las gracias a mis compañeros del Centro de Salud de Corral de Almaguer, por los momentos compartidos, algunos fáciles, otros más

complicados, pero siempre con ilusión por trabajar y vocación por nuestra profesión. Muchos de vosotros sois y seréis un referente para mí.

Y ahora llega el turno de los incondicionales, los que a pesar de las dificultades siempre han estado ahí al pie del cañón, sin importar nada más. En primer lugar quiero dar las gracias a mis amigos, a los que no he visto mucho últimamente (vamos a dejarlo ahí...). Gracias por vuestra comprensión si no he podido estar presente en algún momento importante para vosotros. Sabéis que os quiero mucho a todos, pero también sabéis que Josele y Marisol son mi debilidad. Porque podamos reunirnos pronto (creo que este año tenemos unos cuantos acontecimientos importantes que aún nos quedan por compartir) y reírnos hasta llorar de cualquier tontería sin sentido que solo nosotros podemos entender.

En segundo lugar a mis tías/os (los que están y los que ya se fueron) y primas/os. Gracias por vuestro apoyo, por vuestras palabras de ánimo y comprensión y por vuestro cariño infinito. También a mis abuelos, que desde donde estén, estoy segura que han velado por mí en cada paso que he dado.

A los mejores padres que una podría desear. Si algo he llegado a conseguir en esta vida ha sido gracias a vosotros. Gracias por cuidar de nosotros y por luchar incansablemente para que tanto mi hermano como yo pudiéramos tener un futuro mejor. De vosotros he aprendido todo y todo ha sido bueno. Vuestra humildad os honra y vuestro esfuerzo, valentía y superación constantes han sido un ejemplo de vida para nosotros. Creo que si mi hermano o yo hubiéramos sufrido la milésima parte de lo que os ha tocado vivir a vosotros, habríamos tirado la toalla hace mucho tiempo. Gracias por regalarnos los mejores años de nuestra vida. Porque gracias a vosotros hemos tenido una infancia feliz en la que hemos aprendido a valorar lo realmente importante: la familia. Es por ello que solo puedo sentirme orgullosa de vosotros y decir bien alto y fuerte que os quiero con todo mi corazón. A mi hermano del alma, gracias por tu ayuda, apoyo y cariño desde siempre. Por esa inocencia que te caracteriza y que es la responsable de que todo el mundo te quiera allá por donde vayas. Gracias por ser simplemente *The Best*.

También a Goyo y a Amada. Sois como unos segundos padres para mí. Gracias por preocuparos por mí, por vuestro interés en todo lo que he hecho siempre y por

cuidar de mí como si fuera una hija. Un beso al cielo para la forastera con más clase que ha pisado el pueblo de Corral de Almaguer.

Y por último a ti, a mi futuro marido. Hemos pasado tanto juntos que no sé qué decirte que no sepas ya. Gracias por tu paciencia, ayuda, comprensión y apoyo en todo momento. Gracias por ser la mejor persona con la que podría compartir mi vida. Gracias por seguir a mi lado a pesar de las adversidades. Gracias por ser como eres, porque tienes un corazón tan lleno de bondad que no puedo dejar de cuestionarme a cada momento qué he hecho yo en mi corta vida para ser merecedora de una persona tan maravillosa y especial como tú. Gracias por tu amor incondicional, por tratar de curar mis heridas y sobre todo por luchar por mí y ser mi salvavidas cuando yo ya no tenía fuerzas para seguir. Por una vida y eternidad juntos. *Cé Hé Mise Le Ulaingt.*

LISTA DE FIGURAS/ LIST OF FIGURES

Figura 1.1 Distribución cerebral de la neuropatología de la EA.....	31
Figura 1.2 Factores de riesgo modificables y no modificables de EA	36
Figura 1.3 Polimorfismo genético.....	38
Figura 1.4 Isoformas proteicas y distribución alélica del gen <i>APOE</i>	39
Figura 1.5 Funciones del gen <i>APOE</i>	40
Figura 1.6 Manhattan plot de los factores de riesgo genético de EA identificados en los GWAS	42
Figura 1.7 Grado de contribución de diferentes variantes genéticas al desarrollo de la EA	43
Figura 1.8 Funciones principales de los SNPs <i>CLU</i> , <i>PICALM</i> y <i>CRI</i>	44
Figura 1.9 SNP Val66Met del gen <i>BDNF</i>	50
Figura 1.10 Sistema MEG Elekta neuromag	51
Figura 1.11 Capas de la corteza cerebral y distribución de las neuronas piramidales	52
Figura 1.12 Potencial de acción y potencial postsináptico	53
Figura 1.13 Orientación de los campos magnéticos en el cerebro	54
Figura 1.14 Ritmos cerebrales y definición de las bandas clásicas de frecuencia	55
Figura 1.15 Segregación e integración funcional	58
Figura 1.16 Sincronización y ausencia de sincronización de fase	61
Figura 1.17 Distribución circular de la fase relativa para una señal acoplada con PLV próximo a 1 o desacoplada en fase con PLV próximo a 0	61
Figura 1.18 Interacción entre los diferentes factores y/o mecanismos fisiopatológicos relacionados con la progresión de la EA	62
Figure 3.1 Study I. Example of a syntactic foil in the sentence comprehension test	75
Figure 3.2 Study I. Example of a lexical foil in the sentence comprehension test	75
Figure 3.3 Study I. Flow chart showing all phases in the global study	77
Figure 4.1 Study II. Significant subnetwork in the gamma band	98
Figure 4.2 Study II. Val/Val-Val/Met correlation analysis	101

Figura 5.1. Estudio III. Factores de riesgo genético y afectación de la CF cerebral en individuos cognitivamente intactos.....	109
Figura 5.2 Estudio III. Ejemplo de discriminación alélica de cualquiera de los SNPs de la tabla	114
Figura 5.3 Estudio III. Regiones cerebrales afectadas para el cluster obtenido en la banda delta	122
Figura 5.4 Estudio III. Correlación entre la CF media del cluster en la banda delta y la PRG en mujeres ancianas sanas.....	123
Figura 5.5 Estudio III. Regiones cerebrales afectadas para el cluster obtenido en la banda theta	124
Figura 5.6 Estudio III. Correlación entre la CF media del cluster en la banda theta y la PRG en mujeres ancianas sanas.....	126
Figura 5.7 Estudio III. Regiones cerebrales afectadas para el cluster obtenido en la banda beta 2	127
Figura 5.8 Estudio III. Correlación entre la CF media del cluster en la banda beta 2 y la PRG en mujeres ancianas sanas.....	128
Figura 5.9 Estudio III. Representación de genes hub y genes cuello de botella	133
Figura 5.10 Estudio III. Red de interacción de genes asociados con la EA	134
Figura 5.11 Estudio III. Genes hub, cuello de botella y/o ambos tipos con el grado de asociación/interacción más alto	135
Figura 9.1 Appendix. The UMAM Cognitive Training Program	191

LISTA DE TABLAS/ LIST OF TABLES

Tabla 1.1 Principales rutas moleculares relacionadas con la fisiopatología de la EAOE	44
Table 3.1 Study I. Descriptive statistics (mean and standard deviation) of variables in which groups were matched	72
Table 3.2 Study I. Neuropsychological scores of <i>APOE</i> ϵ 4 allele carriers and non-carriers.....	79
Table 3.3 Study I. Mixed Linear Model results in memory and EF domains.....	80
Table 3.4 Study I. Mixed Linear Model results in sentence comprehension.....	82
Table 3.5 Study I. Mixed Linear Model results in GDS-15	83
Table 4.1 Study II. Characteristics of the participants	93
Table 4.2 Study II. FC results.....	99
Table 4.3 Study II. FC markers correlation analysis.....	102
Tabla 5.1 Estudio III. Características de las participantes.....	111
Tabla 5.2 Estudio III. ORs y frecuencias alélicas de cada uno de los alelos de riesgo de los SNPs de los genes <i>CLU</i> , <i>PICALM</i> y <i>CRI</i>	115

ÍNDICE/ INDEX

AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE FIGURAS/ LIST OF FIGURES	11
LISTA DE TABLAS/ LIST OF TABLES	13
Abstract	19
Resumen	23
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	27
1.1 Envejecimiento normal.....	27
1.2 Demencia tipo Alzheimer	29
1.3 Factores de riesgo de EA no modificables.....	32
1.4 Factores de riesgo de EA modificables: Entrenamiento cognitivo.....	34
1.5 Genética de la EA de inicio tardío I	36
1.5.1 Polimorfismo genético	37
1.5.2 APOE	38
1.6 Genética de la EA de inicio tardío II: Estudios de Asociación del Genoma Completo (GWAS)	41
1.6.1 CLU	45
1.6.2 PICALM.....	46
1.6.3 CRI	47
1.7 Factor Neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	48
1.8 Magnetoencefalografía y ritmos cerebrales	50
1.9 Conectividad Funcional en Estado de Reposo	57
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS GENERALES	65
3. EXPERIMENTAL STUDY I	67
3.1 Introduction.....	67
3.2 Materials and Methods	71

3.2.1 Participants	71
3.2.2 Normalized hippocampal volume	72
3.2.3 APOE genotyping	72
3.2.4 Cognitive training program: UMAM.....	73
3.2.5 Design.....	73
3.2.6 Materials	74
3.2.7 Procedure.....	76
3.2.8 Participant flow diagram	76
3.2.9 Statistical analysis	78
3.3 Results	79
3.3.1 APOE $\epsilon 4$ modulation of training outcomes in memory and EF selected measures....	80
3.3.2 APOE $\epsilon 4$ modulation of training outcomes in language comprehension	81
3.3.3 Could APOE $\epsilon 4$ be related to training outcomes in mood?	82
3.4 Discussion.....	83
3.4.1 Limitations and future directions	86
4. EXPERIMENTAL STUDY II.....	89
4.1 Introduction.....	89
4.2 Materials and Methods	91
4.2.1 Participants.....	91
4.2.2 BDNF & APOE Genotype Test	93
4.2.3 Structural MRI.....	94
4.2.4 MEG.....	94
4.3 Results	97
4.3.1 Participant data.....	97
4.3.2 Correlation analysis between MEG FC data and neuropsychological assessment .	100
4.3.3 Classification.....	102
4.4 Discussion.....	102

4.4.1	<i>Limitations and future directions</i>	105
5.	ESTUDIO EXPERIMENTAL III	107
5.1	Introducción	107
5.2	Materiales y Métodos	109
5.2.1	<i>Participantes</i>	109
5.2.2	<i>Genotipado</i>	112
5.2.3	<i>Cálculo de la PRG</i>	114
5.2.4	<i>RM Estructural</i>	116
5.2.5	<i>MEG</i>	116
5.3	Resultados	121
5.3.1	<i>Conectividad Funcional</i>	121
5.3.2	<i>Volumetrías y pruebas cognitivas</i>	129
5.4	Discusión	129
5.4.1	<i>Limitaciones y líneas futuras</i>	132
6.	REFLEXIONES FINALES	137
7.	CONCLUSIONS	143
8.	REFERENCIAS	145
9.	APPENDIX: The UMAM Cognitive Training Program	189

Abstract

Despite a great deal of research into Alzheimer's disease (AD) over the last 20 years, an effective treatment to halt or slow its progression has yet to be developed. Nowadays, the identification of early biomarkers in order to predict AD is essential not only for early diagnosis, but also for its proper prevention through pharmacological or cognitive interventions. In this sense, genetic risk factors gain special prominence since they account for more than 60% to the development of the disease.

In fact, there is a growing number of works focused on the search for candidate genes, genome-wide association studies (GWAS), etc., to help us map the genetic information in AD, which can provide a new insight into the pathogenesis of the disease as well as the benefits that could be derived from an early approach. Thanks to this type of studies, it is known that the $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E gene (*APOE* $\epsilon 4$) is one of the most recognizable risk factors for late-onset AD susceptibility. Additionally, another genetic polymorphisms, which seem to be associated with AD, have been also discovered (e.g. *CLU*, *PICALM*, *CRI* or *BDNF*).

On the other hand, neuroimaging techniques are leading the way in assessing the disease progression at a stage where neuronal damage has already occurred, but before cognitive impairment becomes manifest. That is why this thesis contemplates the study of cognitive and neurophysiological changes, in a population of cognitively intact (CI) older adults with (and without) genetic risk factors for AD, in order to better establish when these changes should be considered pathological.

Therefore, the main goal of the first study was to explore if there was a differential genotype modulation effect (carriers vs. non-carriers of *APOE* $\epsilon 4$) after the administration of a cognitive training (CT) program in different domains (language comprehension, executive functions and memory) in a sample of 50 CI older adults (65 + years; 30 women and 20 men). All of them participated in a multi-domain CT that involved 30 sessions taking place over 12 weeks. Half of the participants were *APOE* $\epsilon 4$ carriers. The control group was matched in age, gender, normalized hippocampal volume, cognitive reserve, Mini-Mental State Examination (MMSE) score, and Geriatric Depression Scale-Short Version (GDS-15). Results revealed that there were consistent treatment benefits in complex sentence comprehension (non-canonical

sentences and sentences with two propositions), a domain that was not directly trained, but only in the *APOE* $\epsilon 4$ non-carrier group.

In the second study we examined the possible contribution of the *BDNF* Val66Met genetic polymorphism to the acceleration of cognitive decline in aging. It is known that this mutation may affect brain functional connectivity (FC), especially in those who are carriers of the *BDNF* Met allele. So, we explored the influence of this genetic variant in brain eyes-closed, resting-state MEG FC in a sample of 36 CI older females. All of them were $\epsilon 3\epsilon 3$ homozygotes for the *APOE* gene and were divided into two subgroups according to the presence/absence of the Met allele: Val/Met group (n=16) and Val/Val group (n=20). They did not differ in age, years of education, MMSE, or normalized hippocampal volumes. Our results showed reduced antero-posterior gamma band FC within the Val/Met genetic risk group, which may be caused by a GABAergic network impairment.

Finally, in the third study we wanted to go one step beyond and analyse the possible effect of several genes over FC by calculating a polygenic risk score (PRS), since recent evidence emphasizes that such scores improve the predictive value of the risk of developing AD. In this case, we investigated the brain FC of 81 CI older females by assuming that those with a higher PRS would present a greater FC network disruption. The PRS for each individual was obtained by the sum of the manifested risks alleles of 3 genetic polymorphisms for the genes *CLU*, *PICALM* and *CRI*, each one weighted with the logarithm of its odds ratio. The participants did not differ in age, years of education, MMSE, or normalized hippocampal volumes. Furthermore, we controlled for *APOE* status (i.e. carriers vs. non-carriers of the $\epsilon 4$ allele) in order to examine the independent influence of the PRS of interest. Results indicated that the higher the PRS the lower the FC for the delta, theta and beta 2 frequency bands. These outcomes were particularly significant within some brain regions vulnerable to AD such as the medial temporal or the inferior parietal cortices.

Taking everything into account, it can be concluded that despite the benefit derived from the application of a CT program, only those who were free of the *APOE* $\epsilon 4$ negative influence over cognitive functioning obtained positive results. The same applies to the FC studies where those CI older females with higher genetic risk load

suffered the worst impact. Additionally, in all 3 cases the study sample consisted on CI older adults without any evidence of brain structural changes. In the first place this could suggest a future approach to cognitive stimulation therapies focused on personalized medicine and where the genetic load should be considered, and, secondly, a challenge for the imminent neuroimaging-genetic field in which MEG neurophysiological activity, together with carrying several genetic risk factors for AD, could participate as an early biomarker of synaptic neuronal damage before clinical symptomatology becomes manifest.

Resumen

A pesar de la gran cantidad de investigaciones que se han llevado a cabo en relación a la Enfermedad de Alzheimer (EA) en los últimos 20 años, aún no se ha desarrollado un tratamiento eficaz para detener o retrasar su progresión. En la actualidad, uno de los temas de mayor interés consiste en la búsqueda de marcadores tempranos que permitan predecir la EA, tanto para el diagnóstico precoz, como para su prevención mediante la intervención farmacológica y/o la estimulación cognitiva. En este sentido, los factores de riesgo genético cobran especial protagonismo al contribuir en más de un 60% al desarrollo de esta enfermedad.

Cada vez es mayor el número de trabajos focalizados en la búsqueda de genes candidatos, estudios de asociación del genoma completo (GWAS en inglés), etc., con el fin de proporcionar nuevas perspectivas sobre su patogénesis y los beneficios que podrían derivarse de un abordaje precoz de la misma. Gracias a ello se sabe que el ser portador del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (*APOE* $\epsilon 4$) es el factor de riesgo genético más importante de la EA de origen tardío. Asimismo, se han descubierto polimorfismos genéticos de diversos genes (*CLU*, *PICALM*, *CR1* o *BDNF*) que también parecen estar asociados con la enfermedad.

Por otro lado, las pruebas de neuroimagen como la Magnetoencefalografía (MEG) están marcando el camino en la evaluación de la progresión de la EA en una etapa donde el daño neuronal ya ha ocurrido, pero donde aún no se ha manifestado la sintomatología clínica. Es por ello que la presente tesis doctoral contempla el estudio de las alteraciones cognitivas y neurofisiológicas en una población de ancianos sanos con factores de riesgo genético de EA con el objetivo de delimitar cuándo estos cambios se podrían comenzar a considerar patológicos.

Teniendo en cuenta esto, el principal objetivo del primer estudio consistió en explorar si existía un efecto diferencial entre portadores vs. no portadores de *APOE* $\epsilon 4$ tras la administración de un programa de entrenamiento cognitivo (EC) en diferentes dominios (comprensión del lenguaje, funciones ejecutivas y memoria) en una muestra de ancianos cognitivamente intactos (CI). Con este fin se seleccionaron 50 participantes mayores de 65 años (30 mujeres y 20 hombres) a los que se les administró un EC multi-dominio de 30 sesiones durante 12 semanas. La mitad de los participantes eran portadores de *APOE* $\epsilon 4$. El grupo de no portadores estaba equiparado en edad, sexo,

volumen normalizado de hipocampo, reserva cognitiva, puntuación en el Mini-Mental State Examination (MMSE) y la Escala Geriátrica de Depresión-versión corta (GDS-15). Los resultados revelaron que tras la aplicación del EC, los participantes obtuvieron beneficios en la comprensión de oraciones complejas (oraciones no canónicas y oraciones con dos proposiciones), un dominio que no fue directamente entrenado, aunque, dicho efecto, fue únicamente significativo para el grupo de no portadores de *APOE* ϵ 4.

En el segundo estudio examinamos la posible contribución del polimorfismo genético Val66Met del gen *BDNF* sobre la aceleración del deterioro cognitivo en el envejecimiento. Se sabe que esta mutación puede afectar a la conectividad funcional (CF) especialmente en los portadores del alelo Met. Para comprobar esto realizamos un registro de MEG en estado de reposo con los ojos cerrados en una muestra de 36 mujeres CI, homocigotas ϵ 3 ϵ 3 para el gen *APOE* y que a su vez fueron divididas en dos subgrupos de acuerdo a la presencia/ausencia del alelo Met: Val/Met ($n = 16$) y Val/Val ($n = 20$). Ninguno de los dos grupos presentó diferencias en edad, años de educación, MMSE o volumen normalizado de hipocampo. Los resultados mostraron una reducción de la CF antero-posterior para la banda gamma en los Val/Met, lo que podría estar asociado con un posible deterioro de la red GABAérgica.

Finalmente, en el tercer estudio quisimos ir un paso más allá y analizar el posible efecto de varios genes sobre la CF mediante el cálculo de una puntuación de riesgo genético (PRG), ya que parece mejorar el valor predictivo del riesgo de padecer EA. En este caso, estudiamos la CF de 81 mujeres ancianas CI bajo la hipótesis de que aquellas con una PRG más alta deberían presentar una mayor alteración de dicha CF. La PRG se obtuvo a partir de la suma de los alelos de riesgo de 3 polimorfismos genéticos de los genes *CLU*, *PICALM* y *CRI* ponderados por el logaritmo de su odds ratio correspondiente. Asimismo, las participantes no difirieron en edad, años de educación, MMSE o volumen normalizado de hipocampo. Además, la muestra de estudio se estratificó en portadoras vs. no portadoras de *APOE* ϵ 4 con el fin de aislar el efecto perjudicial de este alelo de riesgo y así poder examinar de forma independiente la influencia de la PRG de interés. Los resultados indicaron que cuanto mayor era la PRG, menor era la CF en las bandas delta, theta y beta 2. Estos resultados fueron

particularmente significativos en algunas regiones del cerebro vulnerables a la EA, como la corteza medial temporal o la parietal inferior.

De los resultados expuestos se puede concluir que a pesar de que existe un beneficio derivado de la administración de un EC, solo lo hacen aquellos que estaban libres de la influencia negativa del *APOE* $\epsilon 4$. Lo mismo sucede en los dos trabajos de CF, donde las participantes portadoras de factores de riesgo genético son las que se llevan la peor parte. En los 3 casos, la muestra de estudio está conformada por personas CI sin evidencia de daños en la estructura cerebral, lo que en primer lugar podría sugerir una aproximación futura hacia las terapias de estimulación cognitiva enfocadas en una medicina personalizada donde se tenga en cuenta la carga genética de los individuos y, en segundo lugar, a apostar por el campo de la neurogenética, donde la actividad neurofisiológica registrada por la MEG en base a su asociación con determinados factores de riesgo genético, podría suponer un biomarcador temprano del daño neuronal sináptico antes de que las posibles manifestaciones clínicas de la EA se presenten.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Envejecimiento normal

El envejecimiento es un *“proceso natural de duración variable, homogéneo para cada especie, sobre el que influyen numerosos factores condicionantes, algunos propios del individuo (genéticos) y otros ambientales o circunstanciales. Este proceso es dependiente del tiempo y consiste en un progresivo incremento de la vulnerabilidad y la disminución de la viabilidad del organismo, asociados con una creciente dificultad en las posibilidades de adaptación y una mayor susceptibilidad de contraer enfermedades, lo que eventualmente conduce a la muerte”* (Ollari, 1997).

Según el informe de proyecciones de población 2016-2066 (Instituto Nacional de Estadística; INE, 2016), se espera que la proporción de personas ancianas aumente considerablemente en los próximos años. En la actualidad, el porcentaje de población ≥ 65 años se sitúa en un 18,7% del total y en base a dichas predicciones pasaría a ser del 25,6% en 2031 y del 34,6% en 2066. Por otro lado, la tasa de dependencia (definida como el cociente en tanto por ciento entre la población menor de 16 años o mayor de 64 y la población de 16 a 64 años) incrementaría desde el 53,5% actual hasta el 62,2% en 2031, alcanzando un 87,7% en 2066. Finalmente, la población centenaria pasaría de las 16.460 personas que forman parte de este grupo poblacional hoy en día a más de 222.104 dentro de 50 años.

Como puede observarse, la disminución de las tasas de natalidad y mortalidad infantil, el progreso de la medicina general, la salud pública y, por ende, la calidad de vida en los países industrializados como es el caso de España, se traducen en un aumento de la esperanza de vida. El hecho de que se produzca un incremento en la longevidad es algo valorado de forma positiva por la sociedad, aunque por otro lado, ello podría implicar el aumento del número de personas de edad avanzada que serían susceptibles de desarrollar enfermedades neurodegenerativas en virtud de su supervivencia (Ballesteros-Jiménez, 2016).

Así pues, conforme pasan los años, nuestros aparatos, órganos y sistemas corporales van presentando alteraciones anatómicas y funcionales que forman parte del propio proceso de envejecimiento. Nuestro sistema nervioso, más específicamente

nuestro cerebro, también sufre dichos cambios con independencia de que estén o no asociados a enfermedades neurológicas ligadas a la edad. De este modo, nos encontraríamos con cambios tanto morfológicos como bioquímicos que, en consecuencia, implicarían cambios funcionales. En contraposición a lo que podría encontrarse en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, todos estos cambios ocurren de una manera menos marcada durante el proceso de envejecimiento normal. Algunos de los más relevantes son los siguientes (para una descripción más detallada ver Borrás-Blasco & Viñas-Ribes, 2016):

Cambios morfológicos: A nivel macroscópico, la reducción del tamaño cerebral y los primeros signos de atrofia empiezan a observarse a partir de los 40-50 años de edad. También se puede producir un aumento de líquido cefalorraquídeo y una disminución de la sustancia blanca. Microscópicamente, se produce una pérdida neuronal general (*locus ceruleus* -neuronas catecolaminérgicas-, *substancia nigra* –dopaminérgicas- y núcleo basal de Meynert e hipocampo –colinérgicas-), un aumento de la respuesta glial (en presencia de inflamación) y un descenso del número de dendritas y espinas dendríticas (lo que conduce a alteraciones sinápticas). Además de esto también ocurren alteraciones patológicas celulares que abarcan desde depósitos intracelulares (lipofuscina, melanina, cuerpos de Lewy, proteínas neurofibrilares y amiloides, etc.), y extracelulares (proteínas amiloides, ubiquitina, tau hiperfosforilada, etc.), hasta lesiones vasculares que pueden provocar hemorragias o infartos cerebrales.

Cambios bioquímicos: Desequilibrio de neurotransmisores (así como de las enzimas que los sintetizan y los degradan y la afinidad y número de sus respectivos receptores), pérdida de plasticidad neuronal y alteraciones en los niveles de neurotrofinas.

Cambios metabólicos y circulatorios: Aparición de procesos isquémicos (asociados a arteriosclerosis que junto con la hipoxia, estrés oxidativo e hipoglucemia resultantes, pueden producir excitotoxicidad neuronal como consecuencia de la activación de los receptores de glutamato) y alteraciones en la barrera hematoencefálica (hipertrofia de los pericitos cerebrales).

Cambios funcionales: Déficits sensoriales y motores, alteraciones en la actividad oscilatoria cerebral, deterioro cognitivo, aumento de patologías neurológicas y

psiquiátricas y alteración de la homeostasis. Dentro del deterioro cognitivo se produce una pérdida de funciones cognitivas como la memoria (memoria de trabajo y episódica), la atención, el control ejecutivo, la flexibilidad mental y la velocidad de procesamiento de la información. La memoria semántica, los conocimientos adquiridos o el uso del lenguaje (vocabulario), suelen mantenerse.

A lo largo del presente trabajo, tras conocer de forma general qué cambios se producen en el envejecimiento normal o fisiológico, iremos haciendo alusión a qué características comparte con el envejecimiento patológico y/o qué los diferencia a ambos, de modo que tendremos una guía que sirva para distinguir el proceso de envejecimiento per se del posible desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa (Harada, Natelson Love & Triebel, 2013). Para ello se tendrá en cuenta principalmente el papel de diversos factores de riesgo genético de Enfermedad de Alzheimer (EA).

1.2 Demencia tipo Alzheimer

Las demencias son la tercera causa de muerte en nuestro país por detrás de las enfermedades cardiovasculares (CV) y el cáncer (Institute for Health Metrics and Evaluation, IHME, 2016). Dentro de los distintos tipos de demencia, la EA es la más común con aproximadamente 800.000 personas diagnosticadas en España. De hecho, una de cada 10 personas mayores de 65 años tiene la enfermedad (Instituto Nacional de Estadística, INE, 2016). En la actualidad, la prevalencia de EA es de alrededor de un 5,05% (Niu, Álvarez-Álvarez, Guillén-Grima, & Aguinaga-Ontoso, 2017) y se estima que para el año 2050 habrá más de 115 millones de individuos que padecerán la enfermedad a nivel mundial (Bettens, Slegers, & Van Broeckhoven, 2013).

La EA se caracteriza clínicamente por una pérdida progresiva de memoria (especialmente de la memoria episódica), alteraciones del lenguaje (peor rendimiento en pruebas de denominación por confrontación visual), de la orientación en el espacio y el tiempo, las funciones ejecutivas (peor rendimiento en atención compleja, memoria de trabajo e inhibición de respuesta), así como alteraciones en la conducta (pueden darse casos de disforia y apatía), que repercuten finalmente en la pérdida progresiva de autonomía personal (McKhann et al., 2011; Tellechea et al., 2018).

La acumulación extracelular de proteína beta-amiloide ($A\beta$) en forma de placas, así como el depósito intracelular de proteína tau fosforilada en forma de ovillos

neurofibrilares (Mattson, 2004), conforman las principales características neuropatológicas de la EA. Como se ha mencionado en el apartado 1.1 durante el proceso de envejecimiento normal, estas alteraciones patológicas pueden estar presentes (Borrás-Blasco & Viñas-Ribes, 2016), es decir, existiría cierto grado de fosforilación de proteína tau así como un determinado nivel de acúmulo de proteína A β , pero que sería insuficiente como para cumplir criterios de EA (Dubois et al., 2016) (Figura 1.1). No obstante, cada vez es mayor el número de investigaciones que indican que la patología asociada a la EA comienza incluso 20 años antes de que las manifestaciones clínicas aparezcan (Braak & Braak, 1991; Dubois et al., 2016; Jack et al., 2010, 2013, 2014; Walsh, Drinkenburg, & Ahnaou, 2017), lo que implica que: a) la organización anatómica y funcional del cerebro podría verse alterada mucho antes de que la enfermedad sea diagnosticada y b) la investigación actual debería focalizarse en aquellos colectivos poblacionales que aún no presenten sintomatología asociada.

La patología tau comienza afectando tradicionalmente a la corteza entorrinal y progresa de forma secuencial, estereotipada y predecible entre individuos (Braak & Braak, 1991, 1996; Braak & Del Tredici, 2011) (Figura 1.1, envejecimiento normal; para una nueva visión del comienzo de la EA ver el pie de la figura 1.18). Asimismo, el número y distribución de ovillos neurofibrilares parece correlacionar con la progresión (Vos et al., 2013), gravedad y duración de los síntomas de la EA (Giannakopoulos et al., 2003). Por el contrario, las placas A β se distribuyen de manera más difusa y errática, depositándose inicialmente en el neocórtex temporal, frontal y parietal, así como en el hipocampo (Figura 1.1, envejecimiento normal) y, a diferencia de los ovillos neurofibrilares, la cantidad de placas A β parece no correlacionar ni con la duración ni con la gravedad de los síntomas de la EA (Giannakopoulos et al., 2003; Ingelsson et al., 2004). Además de la formación de los ovillos neurofibrilares y la acumulación de proteína A β , se produce una pérdida de sinapsis neuronales y neuronas piramidales (con los consiguientes déficits de acetilcolina, serotonina, norepinefrina y/o exceso de liberación de glutamato), que conducen a fenómenos de desconexión y/o pérdida de sincronía entre las principales proyecciones corticales (Stern et al., 2004; Brown, Richardson, Collingridge, Randall, & Davies, 2005; citado en Gómez-Isla, Spires, De Calignon, & Hyman, 2008). A su vez, tanto la pérdida neuronal como la sináptica

representan un mejor correlato del funcionamiento cognitivo que el acúmulo de placas de A β y/o de ovillos neurofibrilares (Gómez-Isla et al., 1997).

Finalmente, todas estas alteraciones (acúmulo de placas A β , ovillos neurofibrilares y/o pérdida de sinapsis) podrían estar provocadas por la activación del sistema inmune innato cerebral (microglía y astrocitos) o ser las responsables de la puesta en marcha de la cascada inflamatoria. Así pues, se ha sugerido que el incremento de la reactividad de la microglía no solo podría considerarse como una de las posibles causas de la EA (Heneka et al., 2015; Ransohoff, 2016), sino también como un mejor predictor del deterioro cognitivo que el acúmulo de proteína A β (Buchhave et al., 2010; Cagnin et al., 2001; Edison et al., 2008; Engelhart et al., 2004; Patel et al., 2005).

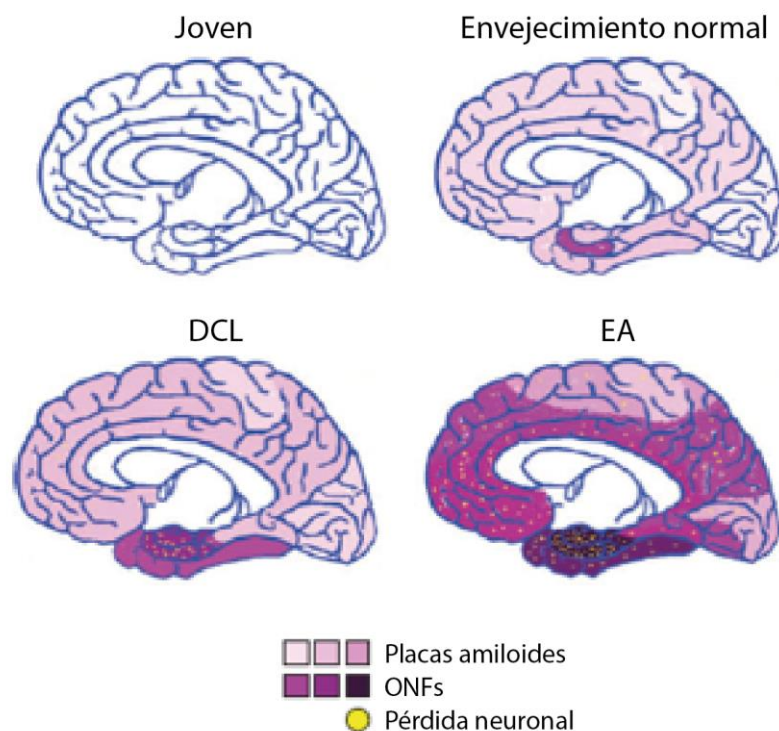


Figura 1.1. Distribución neuroanatómica de placas amiloides, ovillos neurofibrilares (ONFs) y pérdida neuronal durante el envejecimiento normal, deterioro cognitivo leve (DCL), definido como un estado transicional entre el envejecimiento normal y un estadio temprano de demencia (Petersen, 2004; Petersen et al., 2014) y EA. En personas ancianas cognitivamente intactas, las placas amiloides pueden aparecer en el neocórtex y el hipocampo mientras que los ONFs están predominantemente localizados en la corteza entorrinal. El DCL se caracteriza por pérdida neuronal en la capa 2 de la corteza entorrinal y en la región CA1 del hipocampo y, generalmente, va acompañada del aumento en el número y distribución de ONFs. En la EA las placas y los ONFs se distribuyen de forma amplia por todo el cerebro, aunque esto puede variar de unos individuos a otros. En cualquier caso, cuanto mayor sea la pérdida neuronal y/o sináptica mayor será la correlación con el grado de demencia manifestado (Adaptado de Yankner, Lu, & Loerch, 2008).

1.3 Factores de riesgo de EA no modificables

Entre los factores de riesgo de EA no modificables nos podemos encontrar los siguientes:

a) La edad:

La edad es el factor de riesgo más importante para sufrir la enfermedad. La incidencia y prevalencia de la EA se duplica cada 5 años a partir de los 65 años de edad (van der Flier, Pijnenburg, Fox & Scheltens, 2011), y aumenta un 10% para los individuos de 75 años, hasta llegar aproximadamente a un 40% para los mayores de 85 (Ferri et al., 2005).

b) El sexo femenino:

La prevalencia de EA es mayor en las mujeres que en los hombres. Esto puede deberse a que las primeras tienen una mayor esperanza de vida que los segundos (alrededor de 4,5 años; Masters et al., 2015). De igual modo, aunque la incidencia de la EA de origen temprano o familiar (*subapartado c*) es mayor en los hombres que en las mujeres, ésta tiende a igualarse para ambos sexos en edades más avanzadas (entre los 65-75 años), para finalmente ser hasta dos veces mayor en las mujeres a partir de los 75 años (Riedel, Thompson, & Brinton, 2016). Asimismo, un estudio reciente llevado a cabo por Fisher, Bennett y Dong (2018), apunta que los cambios hormonales asociados al proceso de envejecimiento (disminución de los niveles de estrógenos), las tasas de atrofia más rápidas y mayores de la estructura cerebral, el incremento de la respuesta inflamatoria y/o activación microglial, la mayor susceptibilidad ante la respuesta al estrés o el ser portador de determinados factores de riesgo genético, convierten a este colectivo poblacional en foco de estudio como se podrá contemplar en los capítulos 4 y 5 de la presente tesis doctoral.

c) Historia familiar y factores de riesgo genéticos:

Como se describirá a continuación, dentro de esta categoría podemos hacer alusión a aquellos individuos cuyo riesgo genético de contraer la EA es de origen temprano o tardío.

Genética de la EA de inicio temprano: Los casos precoces de EA (≤ 65 años y normalmente entre los 40 y 50 años), suelen presentar un gran componente genético

(producidos por una mutación patogénica), con varios afectados en la familia a edades similares y con un patrón de herencia autosómica dominante (Karch & Goate, 2015). Así pues, la proteína precursora de amiloide (en inglés Amyloid Precursor Protein, APP) o las mutaciones genéticas de la presenilina 1 (PSEN1) (Sobhanifar et al., 2010) y la 2 (PSEN2) son comúnmente conocidas como los genes causales que dan lugar a la EA de origen temprano o EA de origen familiar (EAOF de ahora en adelante; Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991). No obstante, estos casos de inicio precoz suponen menos del 5% de los afectados por la EA.

Genética de la EA de inicio tardío: Una vez que se descubrieron los genes relacionados con la EAOF se comenzó la búsqueda de los genes implicados en la EA de origen esporádico (EAOE de ahora en adelante) o tardío, ya que suponen entre el 90-95% de los casos de EA. La EAOE generalmente se debe a una etiología compleja, multifactorial o poligénica, es decir, donde intervienen factores de riesgo no solo genéticos sino también ambientales, así como la influencia de la edad de inicio y el sexo como factores moderadores (Kamboh, 2004; Lacour et al., 2017). Asimismo, el 25% de las personas que padecen EAOE tienen un familiar afectado (Ritchie & Lovestone, 2002). El gen que codifica la apolipoproteína E (ApoE para la proteína; *APOE* para el gen), es el factor de riesgo genético más determinante en dicha patología (Corder et al., 1993; Chauhan et al., 2015; Mahley, 2016). De igual modo, gracias al avance de las técnicas de secuenciación masiva y a los estudios genéticos de asociación del genoma completo (en inglés genome-wide association studies, GWAS), se han identificado nuevos factores de riesgo genético relacionados con la EAOE (Lambert et al., 2009, Harold et al., 2009), donde a diferencia de la EAOF (de origen causal) su presencia o ausencia no es causa ni necesaria ni suficiente para que la enfermedad se desencadene, sino que aportan un determinado nivel de susceptibilidad asociado a su padecimiento (Myers et al., 1996).

Tanto los genes de la EAOF como los de la EAOE se apoyan en la hipótesis de la cascada amiloidea (Hardy & Higgins, 1992). Los primeros, porque su descubrimiento ayudó a describir las características neuropatológicas de la enfermedad dada su implicación en el procesamiento de la APP (Bertram, McQueen, Mullin, Blacker, & Tanzi, 2007) y, los segundos (por ejemplo *APOE*, *CLU*, *PICALM* y *CRI*), por su mayor o menor grado de participación en el aclaramiento de la proteína A β (Harold et al.,

2009). En los apartados 1.5 y 1.6, se hará una descripción más detallada del funcionamiento del gen *APOE* (rs429358 y rs7412), así como de algunas de las variantes genéticas de la EAOE encontradas en los GWAS (el SNP rs11136000 del gen *CLU*, el SNP rs3851179 del gen *PICALM* y el SNP rs6656401 del gen *CRI*). Finalmente, en el apartado 1.7 se describirá el mecanismo de acción de otra variante genética de EAOE, el SNP Val66Met del gen *BDNF* (rs6265)¹, más directamente relacionado con funcionamiento cognitivo y cuyo déficit y/o alteración podría repercutir en una pérdida de conexiones sinápticas entre diferentes regiones cerebrales.

1.4 Factores de riesgo de EA modificables: Entrenamiento cognitivo

El enfoque de la investigación de la EA y de la demencia en general ha evolucionado desde la identificación de diferentes factores de riesgo modificables, hacia el uso de esta información para desarrollar intervenciones que puedan prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad, así como para identificar poblaciones especiales de alto riesgo que podrían ser objeto de ensayos de intervención (Imtiaz, Tolppanen, Kivipelto, & Soininen, 2014).

Cada vez es mayor el número de investigaciones que sugieren que una alimentación sana, la realización de ejercicio físico, el contacto social, o el entrenamiento/actividad mental, ayudan a conseguir un envejecimiento saludable, así como contribuir a la prevención del deterioro cognitivo o el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Mendiola-Precoma, Berumen, Padilla, & García-Alcocer, 2016; Nelson & Tabet, 2015; para un resumen general sobre los factores de riesgo modificables y no modificables de la EA, véase la figura 1.2). En este sentido, el descubrimiento de que el cerebro del mayor todavía conserva plasticidad, ha producido un aumento en el número de estudios dirigidos hacia la investigación de la eficacia de distintos tipos de intervenciones para mantener y/o mejorar aquellos procesos cognitivos que se deterioran con la edad (Ballesteros-Jiménez 2016). Además, se sabe

¹ Los **rs** son los números de identificación del gen, disponibles en la base de datos de dbSNP, que a su vez se halla contenida en la web del National Center for Biotechnology Information (NCBI, dbSNP: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). De este modo, cada SNP (Single Nucleotide Polymorphism por sus siglas en inglés) de cada gen (en este caso en particular los de los genes *APOE*, *CLU*, *PICALM*, *CRI* y *BDNF*), tendrá su identificador correspondiente.

que la eficacia de este tipo de intervenciones podría estar mediada por el nivel de reserva cognitiva de los individuos (nivel educativo, ocupación laboral, etc.) y, donde valga la redundancia, los procesos cognitivos son cruciales para explicar las diferencias entre una persona que manifiesta déficits cognitivos y otra persona que no los tiene, a pesar de que en ambas se presenten cambios cerebrales o una patología similar (Stern, 2012).

En la presente tesis doctoral se ha estudiado cómo la administración de un programa de entrenamiento cognitivo puede contribuir a la mejora de determinadas funciones cognitivas teniendo en cuenta la carga genética de los individuos sometidos a estudio (ancianos sanos portadores versus ancianos sanos no portadores del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*; ver capítulo 3).

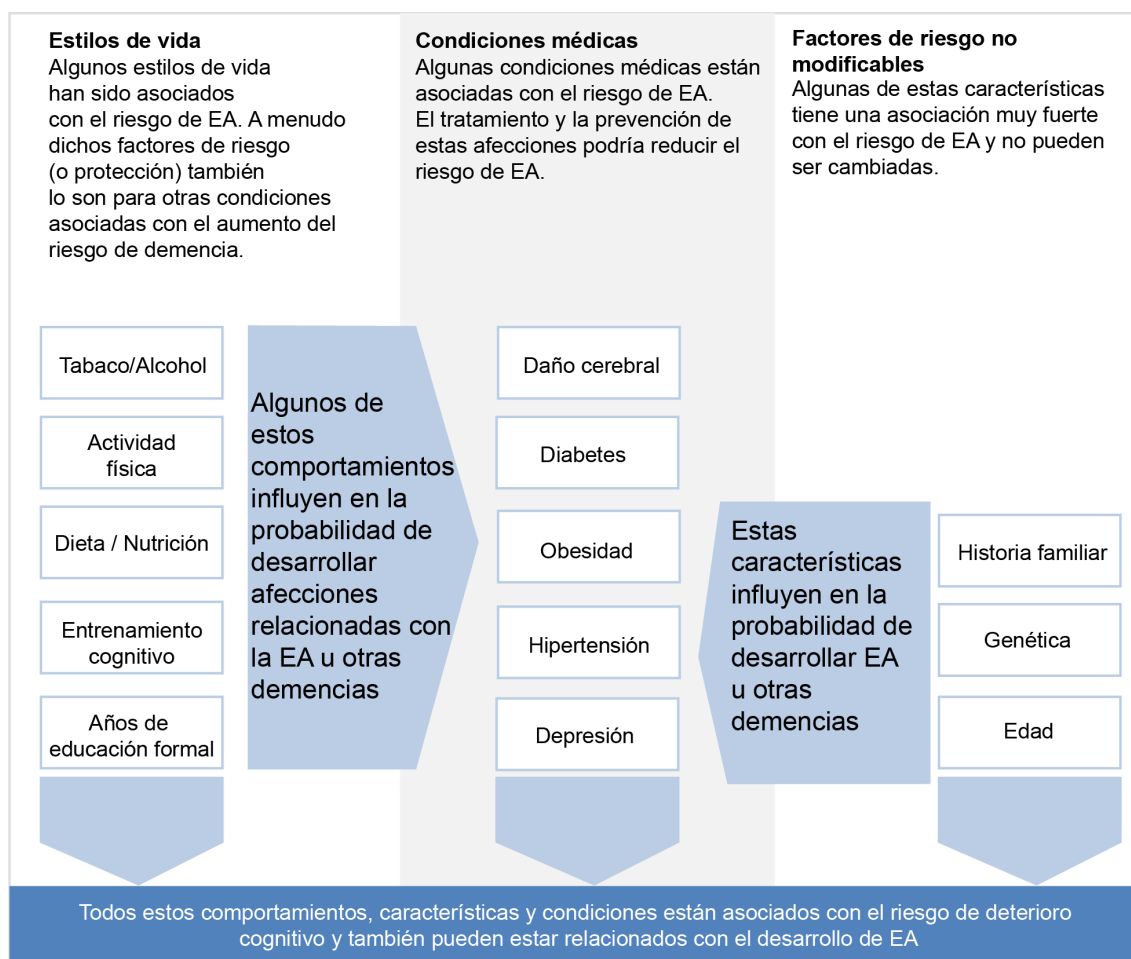


Figura 1.2. El presente diagrama presenta un resumen de posibles factores de riesgo de EA. Aquellos considerados como factores de riesgo modificables, los podemos clasificar en dos categorías: estilos de vida y condiciones médicas. La mayoría de las campañas de prevención y promoción de la salud están centradas en los factores enumerados en ambas categorías. Asimismo, dicha aproximación no es exclusiva de la EA sino que también estaría enfocada en el abordaje y/o prevención de otras demencias y/o enfermedades neuropsiquiátricas (Adaptado de la OECD, 2015).

1.5 Genética de la EA de inicio tardío I

Como se ha podido entrever en apartados previos, la causa de la EA sigue siendo una incógnita, aunque parte de la respuesta a ese interrogante recae en la genética. Durante muchos años, las investigaciones científicas se han enfocado en el estudio de genes específicos que pueden contribuir en mayor o menor probabilidad al desarrollo de la enfermedad, pero antes de adentrarnos en una descripción más pormenorizada de los mismos, vamos a hacer un pequeño inciso para explicar en qué consiste un polimorfismo genético.

1.5.1 Polimorfismo genético

Al comparar el genoma de diferentes individuos, se encuentran cambios en la secuencia del ADN, los cuales, en la mayoría de los casos, no afectan al fenotipo (esto es, las características observables de un organismo como resultado de la interacción entre su genotipo y el ambiente). Es decir, muchas veces este concepto se asocia con un cambio genético que no causa enfermedad, lo cual no tiene por qué ser exactamente así, ya que éstos, al igual que pueden participar en el color de nuestros ojos o nuestro tipo de pelo, también pueden conferir susceptibilidad a padecer una determinada enfermedad, así como también a disminuir su probabilidad de aparición. Por lo tanto, podemos tener polimorfismos que sean de riesgo, otros benignos y otros que no tengan ningún efecto.

Como veremos a continuación, los polimorfismos genéticos se suelen utilizar para la caracterización de enfermedades complejas (como la EA), especialmente en estudios de asociación, donde se comparan las frecuencias de los correspondientes alelos entre individuos controles y pacientes afectados por una determinada enfermedad. Los de un solo nucleótido o SNPs son los más utilizados para el cartografiado genómico, consisten en el cambio de una sola base nucleotídica (adenina –A-, guanina –G-, citosina –C-, timina –T-) y están ampliamente distribuidos por el genoma humano (representando el 90% de la variabilidad donde la variante menos frecuente existe como mínimo en un 1% de la población; ver figura 1.3).

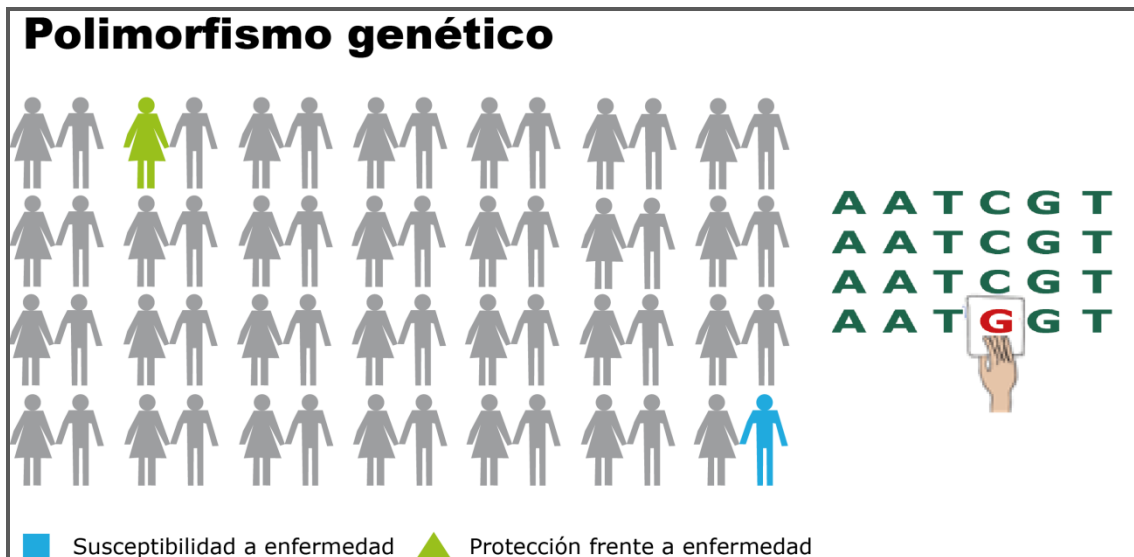


Figura 1.3. Polimorfismo genético. Si alineáramos la secuencia de ADN de un individuo con la del resto de la población, podríamos observar que dicha secuencia es prácticamente idéntica a la de sus congéneres. Sin embargo, en algunas partes de la secuencia puede darse un cambio de nucleótido (por ejemplo una C por una G, figura de la derecha), que hace que ciertos individuos puedan tener predisposición a desarrollar una enfermedad, otros estén protegidos frente a ella, mientras que la mayor parte de la población no se ve afectada (figura de la izquierda). (Extraído y adaptado de http://www.inmegen.gob.mx/tema/cms_page_media/210/polimorfismo.gif; https://www.23andme.com/res/img/public/gen101/thumbnails/Z7P6c4iwpQAQWE8NB7ud_g_video_2_1.png).

Se ha estimado que existen alrededor de 50.000-200.000 SNPs que pueden ser importantes desde el punto de vista biológico (Chanock, 2001; Risch, 2000). Algunos de ellos pueden ser SNPs exónicos, es decir, se encuentran en regiones codificantes del ADN pudiendo modificar o no la cadena de aminoácidos que producen, siendo por lo tanto los que más impacto tienen sobre la función de una proteína. Por el contrario, otros SNPs son intrónicos, se encuentran en regiones no codificantes y actúan principalmente sobre la regulación génica (Orr & Chanock, 2008). Una vez contemplada esta información general, se procede a describir las funciones de los distintos SNPs de los genes considerados en la presente tesis doctoral.

1.5.2 APOE

El gen *APOE* está localizado en el cromosoma 19q13.32. Dos SNPs, localizados en el cuarto de los cuatro exones que forman el gen (rs429358—de timina a citosina; rs7412—de citosina a timina), dan lugar a tres haplotipos conocidos como los alelos ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 , que a su vez producen tres isoformas proteicas diferentes (ApoE2, ApoE3,

ApoE4) derivadas de los cambios de aminoácidos cisteína y arginina en las posiciones 112 y 158 (ApoE2: Cis-112, Cis-158; ApoE3: Cis-112, Arg-158; ApoE4: Arg-112, Arg-158) (Hanlon & Rubinsztein, 1995; Mahley, 1988; Malhey & Rall, 2000) (ver figura 1.4).

	Posición de los aminoácidos		Frecuencia alélica	
	112	158	General	EA
APOE2	Cis	Cis	8,4%	3,9%
APOE3	Cis	Arg	77,9%	59,4%
APOE4	Arg	Arg	13,7%	36,7%

Figura 1.4. Isoformas proteicas codificadas por los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ del gen *APOE* y distribución alélica en la población general y en individuos con Enfermedad de Alzheimer; Cis: cisteína; Arg: arginina (Adaptado de Liu, Liu, Kanekiyo, Xu, & Bu, 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, durante las dos últimas décadas, el ser portador del alelo $\epsilon 4$ se ha considerado como el factor de riesgo genético con más peso para el desarrollo de la EAOE (Chartier-Harlin et al., 1994; Chauhan et al., 2015; Corder et al., 1993; Houlden et al., 1998; Mahley, 2016 Paulson & Igo, 2011). En el meta-análisis llevado a cabo por Bertram et al., (2007), se encontró que el alelo $\epsilon 4$ incrementa el riesgo de EA hasta 4 veces en comparación con el riesgo de ser portador del alelo $\epsilon 3$ (es decir, $\epsilon 3\epsilon 4$). Si además se es homocigoto para el alelo $\epsilon 4$ (es decir, $\epsilon 4\epsilon 4$), el riesgo incrementa hasta 15 veces más (Farrer et al., 1997; citado en McGuinness et al., 2010). Por el contrario, el alelo $\epsilon 3$ se considera neutro ante el desarrollo de la enfermedad y el ser portador del alelo $\epsilon 2$ parece conferir un carácter protector (Corder et al., 1994; Suri, Heise, Trachtenberg, & Mackay, 2013). La proteína que codifica el gen *APOE* está implicada en numerosas funciones en nuestro cerebro como la regulación del transporte lipídico, la regulación del aclaramiento de la proteína A β , la fosforilación de la proteína tau, la permeabilidad cerebrovascular, la integridad de la barrera hematoencefálica, la respuesta inflamatoria, el metabolismo de la glucosa, la función mitocondrial y/o el mantenimiento de la función sináptica (Bu, 2009; Tai et al., 2016). Los efectos negativos que puede ejercer este gen sobre las funciones

mencionadas dan como resultado un balance de pérdidas y ganancias funcionales que va a favor de un aumento de la toxicidad cerebral (como consecuencia de ser portador del alelo $\epsilon 4$), o en detrimento de sus posibles efectos neuroprotectores (más propios de los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$) (Liu et al., 2013; figura 1.5).

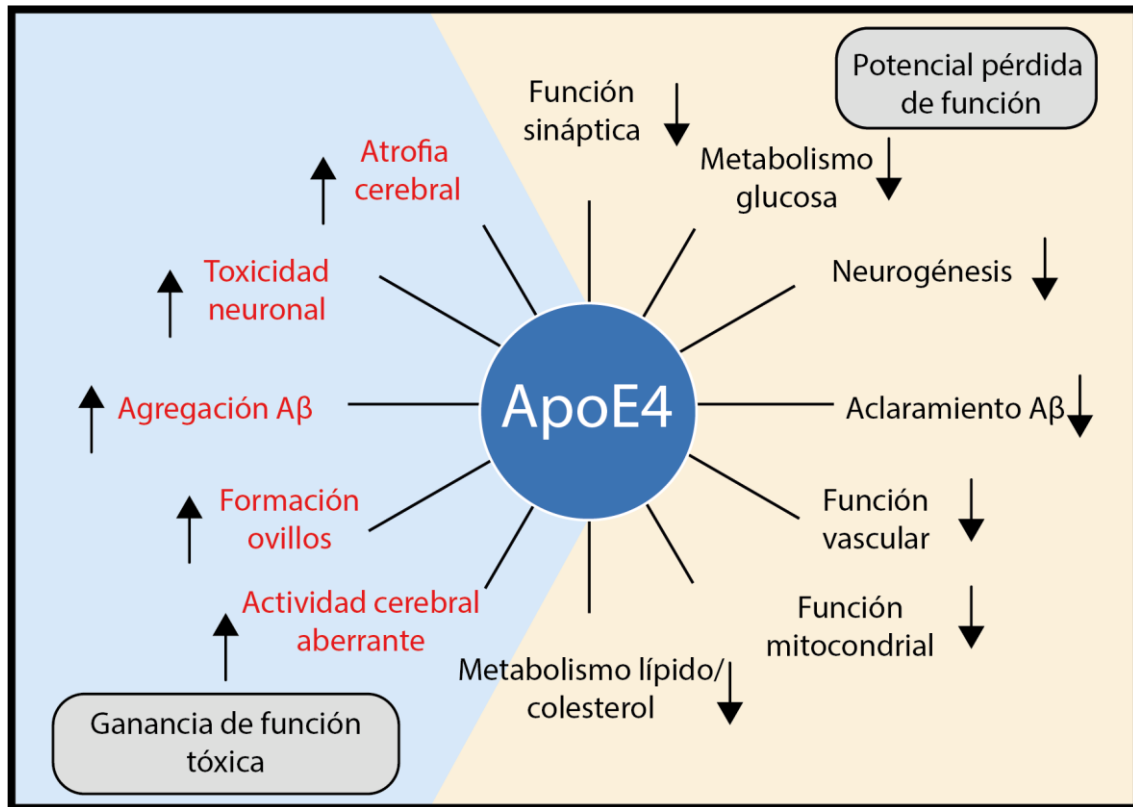


Figura 1.5. Funciones de la expresión de la proteína ApoE4 en la EA. La proteína ApoE4 puede producir pérdida de funciones neuroprotectoras, ganancia de funciones tóxicas o ambas (Adaptado de Liu et al., 2013).

Asimismo, y debido a esta diversidad funcional, este gen juega un papel crucial no solo en relación con la EA, sino también con respecto a otras enfermedades como la esclerosis múltiple, Parkinson, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades CV, etc. (Giau, Bagyinszky, An, & Kim, 2015). Es por ello que el ser portador de al menos una copia del alelo $\epsilon 4$ conlleva un impacto negativo en la esperanza de vida de los individuos (Wattmo, Londos, & Minthon, 2014). Para más información sobre el rol de este gen a nivel cognitivo véase el capítulo 3.

1.6 Genética de la EA de inicio tardío II: Estudios de Asociación del Genoma Completo (GWAS)

Se estima que la heredabilidad de la EAOE es de alrededor del 70-80% (Braskie, Ringman, & Thompson, 2011; Gatz et al., 2006). Esto ha llevado, durante las últimas tres décadas, a la búsqueda de otras variantes genéticas además de *APOE* y las mutaciones autosómicas dominantes relacionadas con el inicio temprano de la enfermedad (Bertram, et al., 2007). Estas variantes, aunque con un efecto más pequeño en la susceptibilidad a desarrollar EA (entre un 10-20%; Kohannim et al., 2013), están posibilitando un mejor entendimiento de la misma. Esto ha sido posible gracias al avance de las técnicas de secuenciación masiva y al aumento del conocimiento del genoma humano, lo que ha permitido obtener no solo un panorama más amplio con respecto a las vías moleculares subyacentes a la progresión de la EA, sino también al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas (Song et al., 2015).

Una vez descrito en qué consiste un SNP (subapartado 1.5.1), se puede decir que los GWAS se basan esencialmente en el genotipado de cientos de miles (o millones) de ellos. Dicho genotipado se realiza en un gran número de casos y controles con respecto a una determinada enfermedad. Aquellas variantes genéticas que sean más comunes en un grupo que en otro, se considerarán asociadas con la enfermedad. Si son más comunes en el grupo control se considerarán como variantes protectoras (con una odds ratio -OR- OR <1), mientras que, si lo son para el grupo de casos, estarán asociadas con un mayor riesgo (OR >1). Debido a que se obtienen multitud de variantes que podrían estar asociadas, se tienen en cuenta únicamente las que superen un nivel de significación de $p < 5 \times 10^{-8}$, de modo que aquellas que se encuentren entre 5×10^{-5} y 5×10^{-8} se considerarán moderadamente significativas (ver figura 1.6). Algo muy importante en los GWAS es la replicación de los resultados, tanto para una misma población, como para poblaciones diferentes, ya que pueden existir variantes causales raras específicas de una población, pero no de otra/s. Así pues, volvemos a incidir en el hecho de que gracias a los GWAS se ha podido confirmar que el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* incrementa el riesgo de padecer la EA, así como la identificación de nuevas variantes genéticas de riesgo (Bettens, et al., 2013).

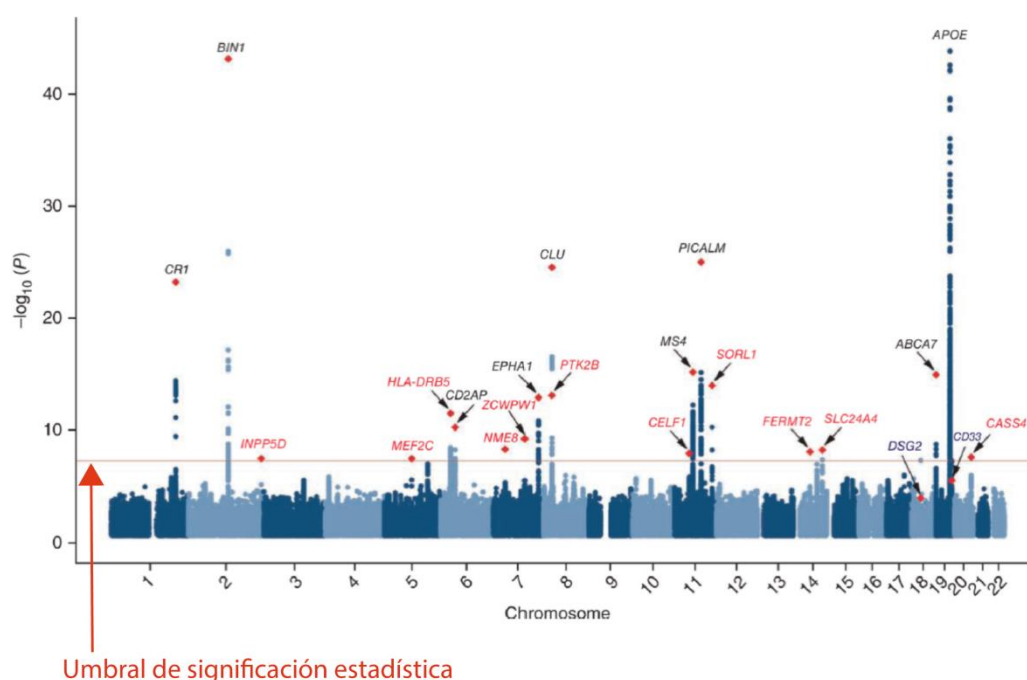


Figura 1.6. Manhattan plot donde se representan los genes asociados con el riesgo de padecer EA del GWAS llevado a cabo por Lambert et al., en 2013 (ver el párrafo siguiente). Los genes identificados en GWAS previos se representan en color negro y los nuevos candidatos se representan en color rojo (Extraído de Lambert et al., 2013).

Además de los dos primeros GWAS llevados a cabo en 2009 (Lambert et al., 2009, Harold et al., 2009), el proyecto internacional sobre el estudio de la genómica de la EA (IGAP por sus siglas en inglés: International Genomics of Alzheimer's Project), es un consorcio que volcó todos sus esfuerzos para llevar a cabo el GWAS sobre la EAOE más grande hasta la fecha, con una población total de 74.046 individuos (Lambert et al., 2013). Tras este estudio a gran escala se confirmó la asociación de genes previamente implicados en la EA ya descritos en los GWAS iniciales, y se descubrieron nuevos genes candidatos suponiendo más de 20 factores de riesgo genético de la EAOE en la actualidad (Karch & Goate, 2015) (ver figura 1.7). Algunos de ellos son el gen clusterin (*CLU*) también conocido como APOJ, el gen *CR1* o el gen *PICALM* (Ferrari et al., 2012; Jun et al., 2010). La identificación de estas variantes de riesgo genético, aunque con un efecto moderadamente pequeño (ORs entre 0,88 y 1,23) en cuanto al riesgo de desarrollar EA en comparación al gen *APOE* y las formas tempranas de la EAOE (Lambert et al., 2009; Seshadri et al., 2010; Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011), ha propiciado el descubrimiento de al menos tres rutas moleculares

principales cuya disfunción podría estar relacionada con el riesgo de padecer EA. Estas rutas son: el metabolismo lipídico, el sistema inmune y la vía de endocitosis (Guerreiro, Bras, & Hardy, 2013a; Karch & Goate, 2015; Morgan, 2011; Pimenova, Raj, & Goate, 2018). (Figuras 1.7 y 1.8 y Tabla 1.1).

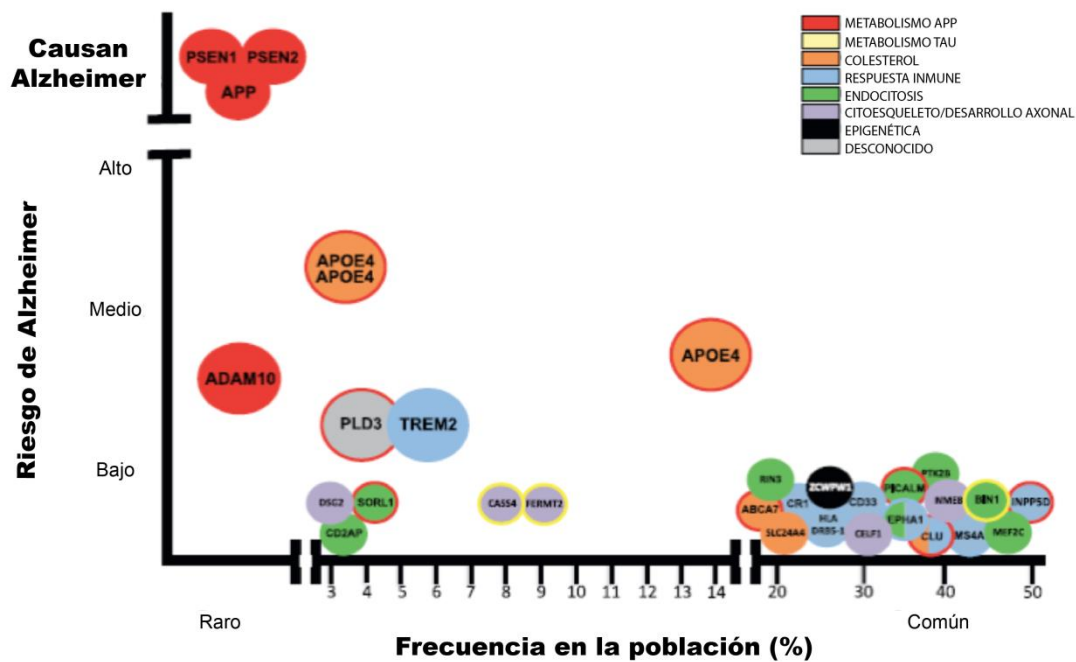


Figura 1.7. Grado de contribución de diferentes variantes genéticas al desarrollo de la EA. En el eje de abscisas se puede observar la frecuencia de estas variantes genéticas en la población (raras vs. comunes) y en el eje de ordenadas aparece el riesgo asociado de EA para cada una de ellas (bajo, medio y alto), así como los genes causales de la EA (esquina superior izquierda). Además, las diferentes variantes genéticas están pintadas de distintos colores de acuerdo a su función biológica. Así por ejemplo, los portadores de un alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* tienen un riesgo medio de padecer la EA, siendo su frecuencia en la población medianamente común. Sin embargo, los homocigotos para el alelo $\epsilon 4$ del mismo gen (es decir, $\epsilon 4\epsilon 4$), tienen un riesgo medio-alto de padecer la EA, pero su frecuencia en la población es menos común. Finalmente, todos los SNPs a los que hemos hecho alusión a lo largo de la presente introducción (es decir, *CLU*, *PICALM*, *CRI*), son muy comunes en la población, pero el riesgo asociado a padecer la EA es bajo (Adaptado de Karch & Goate, 2015).



Figura 1.8. Ampliación de las funciones principales de algunos de los genes estudiados en base a la leyenda de la Figura 1.7. Metabolismo APP: rojo; colesterol: naranja; respuesta inmune: azul; endocitosis: verde.

Tabla 1.1. Principales rutas moleculares relacionadas con la fisiopatología de la EAOE y algunos genes característicos de cada una de ellas (Elaborado a partir de Pimenova et al., 2018).

Metabolismo lipídico	Respuesta inmune	Endocitosis
<ul style="list-style-type: none"> - <i>APOE</i> - <i>CLU</i> - <i>ABCA7</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>CR1</i> - <i>CLU</i> - <i>CD33</i> - <i>TREM2</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>PICALM</i> - <i>SORL1</i> - <i>BIN1</i> - <i>CD2AP</i>

Así pues, al igual que en el caso del gen *APOE*, el gen *CLU* actuaría sobre el metabolismo lipídico, o del colesterol, así como en el metabolismo de la APP. De igual modo, también estaría implicado en la puesta en marcha de la respuesta inmune junto con el gen *CR1*. Por último, el gen *PICALM* participaría en la vía de endocitosis además de actuar también en el metabolismo de la APP (ver figura 1.8). En cualquier caso, se ha de hacer un matiz importante con respecto a esto. Se ha de tener en cuenta que, aunque estos genes tienen cierta asociación con el metabolismo de la APP y por lo tanto con el entendimiento de la EA desde la hipótesis clásica de la cascada amiloide, el descubrimiento de la disfunción de estos “nuevos” mecanismos biológicos ofrece una

explicación patogénica alternativa otorgándole un papel más protagonista a las denominadas vías no amiloidogénicas de la EA (Louwershimer et al., 2016). Este hecho es reflejado en la figura 1.8. Por ejemplo, el gen *CLU* está implicado en el metabolismo del colesterol (mitad del círculo pintado de naranja) y la respuesta inmune (mitad del círculo pintado de azul). A su vez, el contorno del mismo, de color rojo, hace alusión al metabolismo de la APP, función que tiene un papel más secundario en comparación a las otras dos. A continuación, se enumerarán algunos de los principales hallazgos encontrados en diferentes estudios de neuroimagen para cada uno de estos genes de forma individual. Esta descripción servirá de base para la comprensión de los resultados obtenidos en el capítulo 5, donde se ha tenido en cuenta el efecto acumulado de estos 3 genes sobre la conectividad funcional (CF) cerebral a partir del cálculo de una puntuación de riesgo genético (PRG).

1.6.1 *CLU*

Después del gen *APOE*, el gen *CLU* es uno de los factores de riesgo genético más estrechamente relacionados con la susceptibilidad a desarrollar EA, donde el 88% de la población de origen Caucásico es portadora del alelo de riesgo (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009, 2013). Se localiza en el cromosoma 8 y la proteína que codifica está implicada en multitud de funciones como la regulación y el aclaramiento de la proteína A β , el transporte del colesterol, la respuesta inmune inflamatoria, la apoptosis o muerte neuronal, etc., por lo que se le ha considerado como una proteína chaperona, es decir, proteínas que favorecen la función de otras proteínas (por ejemplo su plegamiento), para que éstas lleguen a ser lo más funcionales posibles (Morgan & Carrasquillo, 2013). Sin embargo, dependiendo de la mutación y/o del tipo de cadena de aminoácidos que tengamos, la chaperona puede ser útil o no serlo. El SNP rs11136000 de este gen se ha asociado ampliamente con el riesgo de EA. Éste se encuentra en una región intrónica, por lo que a priori no se espera que vaya a tener un efecto en el funcionamiento de la proteína (Harold et al., 2009). Se ha observado que el ser portador del alelo C está relacionado con una menor expresión de la proteína en el tejido cerebral aumentando el riesgo de EA, mientras que el ser portador del alelo T incrementaría su expresión (protegiendo frente a la formación de agregados y contribuyendo al aclaramiento de A β), y, reduciendo así, el riesgo de sufrir EA (Roussotte, Gutman,

Madsen, Colby, & Thompson, 2014). Estudios recientes constatan este hecho al confirmar que individuos homocigotos CC presentan más depósitos de amiloide que los heterocigotos CT o los homocigotos TT (Tan et al., 2016). Asimismo, también se han encontrado alteraciones en la microestructura de la sustancia blanca de adultos jóvenes portadores del alelo de riesgo (por ejemplo, CT), siendo este efecto mucho más fuerte para los homocigotos CC (Braskie et al., 2011a). Esta alteración que como consecuencia conlleva a una disminución de la CF, estaría mediada por un fallo en el metabolismo lipídico, que, finalmente, termina afectando a la estructura lipídica de la vaina de mielina. En otro estudio llevado a cabo en personas jóvenes (con una edad media de 30-35 años) también se ha objetivado una disminución en la comunicación entre el hipocampo y el córtex prefrontal durante una tarea de memoria en aquellos individuos portadores del alelo C (Erk et al., 2011).

1.6.2 *PICALM*

El gen *PICALM* (del inglés Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein) se encuentra en el cromosoma 11 y, al igual que el gen *CLU*, fue identificado por primera vez como factor de riesgo genético de la EA en el 2009 (Harold et al., 2009). En concreto, el SNP rs3851179 de este gen ha sido el más replicado en los GWAS, aunque también se han encontrado otros SNPs de interés dentro de este gen (Naj et al., 2011). Participa en varios procesos celulares entre los que destacan la endocitosis (transporte neuronal de moléculas) por acción de la proteína clatrina, siendo dicho transporte esencial para la correcta transmisión sináptica (Morgan, 2011). Asociado a este proceso de endocitosis también podría verse afectada la internalización de la APP y por lo tanto la producción de A β (Xiao et al., 2012). Asimismo, otros estudios también lo han asociado con el depósito de ovillos neurofibrilares y el desarrollo de la patología tau (Ando et al., 2013). Por ejemplo, se sabe que los homocigotos para el alelo G (es decir, GG) tienen más riesgo de tener EA que los que son heterocigotos (es decir, AG), mientras que los que son homocigotos AA tendrían menos riesgo de padecer la enfermedad (siendo la menos común en la población). Así pues, en un estudio en una población de adultos sanos se observó que los portadores del alelo de riesgo G mostraron una menor conectividad entre el hipocampo y otras regiones corticales que los homocigotos para el alelo protector (Zhang et al., 2015).

Asimismo, en otra investigación con personas sanas comprendidas entre los 20 y los 79 años, se encontró un incremento de potencia en la banda de frecuencia beta para los homocigotos GG, que fue más pronunciada entre los más mayores y que podría estar asociada a una probable hiperexcitabilidad cortical (Ponomareva et al., 2017). Finalmente, se ha observado una menor atrofia en la corteza entorrinal para aquellos portadores de la variante protectora (Furney et al., 2011; Harold et al., 2009).

1.6.3 *CRI*

El gen *CRI* (del inglés complement component 3b/4b/ receptor 1), es un gen localizado en el cromosoma 1 y, a diferencia del gen *CLU* o el gen *PICALM*, su expresión en el cerebro es baja (Singhrao, Neal, Rushmere, Morgan, & Gasque, 1999). Este gen está implicado en la regulación del sistema del complemento, uno de los componentes fundamentales de la conocida respuesta inmunitaria defensiva ante un agente patógeno. Además, participa en el transporte de opsoninas al torrente sanguíneo (moléculas que ayudan a mejorar la fagocitosis) para una eliminación eficiente de microorganismos o bacterias (Morgan & Carrasquillo, 2013). Por lo tanto, y como se ha mencionado en líneas precedentes (apartado 1.2), este gen podría estar involucrado en los procesos de neuroinflamación que contribuyen a la patología de la EA (Morgan, 2011). El SNP rs6656401 de este gen se encuentra en una región intrónica (Han, H. Huang, Gao, & Q. Huang, 2017), es uno de los más replicados en los GWAS y, donde los homocigotos AA, tendrían más predisposición a padecer EA que los heterocigotos AG o los homocigotos GG. En un estudio longitudinal en una muestra de ancianos sanos al momento del reclutamiento, los investigadores observaron que de todos los genes tenidos en cuenta (*CLU*, *PICALM* y *CRI*), únicamente los portadores del alelo de riesgo del SNP rs6656401, mostraron un mayor deterioro cognitivo global que además estaba mediado por el acúmulo de proteína A β (Chibnik et al., 2011). Con respecto a este mismo SNP, Bralten et al. (2011) hallaron en una muestra de adultos jóvenes un adelgazamiento de la corteza entorrinal entre los portadores del alelo de riesgo frente a los no portadores, lo que podría repercutir en una mayor susceptibilidad para desarrollar la EA en etapas posteriores de la vida.

1.7 Factor Neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*)

Las neurotrofinas son moléculas que se expresan naturalmente en el Sistema Nervioso Central (SNC) durante el desarrollo y a lo largo de la vida adulta. El descubrimiento del factor de crecimiento neuronal (Nerve Growth Factor en inglés o NGF) por Levi-Montalcini y Hamburger en 1951 (Levi-Montalcini & Hamburger, 1951), dio comienzo a una nueva etapa en el conocimiento de la neurobiología, al demostrar que las neuronas son las constructoras de sus propias redes, utilizando para ello mecanismos dinámicos altamente complejos. El BDNF es una de las neurotrofinas más estudiadas. Se distribuye de forma homogénea en todo el cerebro (Zhang et al., 2007), promoviendo sus efectos principalmente en neuronas del ganglio espinal, hipocampo y corteza cerebral (Huang & Reichardt, 2001). El BDNF desempeña un papel muy importante en la plasticidad sináptica, diferenciación neuronal, proliferación de la arborización dendrítica y ramificación axonal (Egan et al., 2003). No obstante, durante la vida adulta, se cree que su rol está más enfocado hacia la plasticidad neuronal (que implica tanto cambios funcionales como estructurales), por lo que se le relaciona con la potenciación neuronal a largo plazo y procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje (Bath & Lee, 2006; Binder & Scharfman, 2004; Egan et al., 2003; Horch, Krüttgen, Portbury, & Katz, 1999). Como se ha mencionado en el apartado 1.1, uno de los principales signos patológicos de la EA es la muerte neuronal y/o pérdida de sinapsis. De este modo, el estudio de las neurotrofinas ha adquirido recientemente un interés creciente por su papel como mediadores endógenos encargados de dar soporte y protección a las neuronas frente a condiciones adversas como la excitotoxicidad, isquemia o degeneración neuronal (Ichim, Tauszig-Delemasure, & Mehlen, 2012).

Sin embargo, la expresión, secreción y la acción de dichos factores de crecimiento puede verse alterada por la influencia de diversas mutaciones genéticas como la producida por el SNP Val66Met del gen *BDNF*, cuyo efecto podrá acabar modificando la transmisión sináptica y, en consecuencia, la CF cerebral (ver capítulo 4). Para entender cuál sería el mecanismo de acción patológico de este SNP, se ha de comprender en primer lugar cómo se lleva a cabo la síntesis de dicha neurotrofina.

En primer lugar, el BDNF se sintetiza como una proteína precursora (pre-proBDNF), que a su vez da lugar a dos formas de BDNF extracelular: proBDNF y

BDNF maduro. Por otro lado, ambas formas proteicas se unen a dos tipos de receptores: los denominados receptores de alta afinidad de tirosina quinasa (TrkA, TrkB y TrkC) o el receptor de baja afinidad (p75) (Minichiello, 2009, Teng & Hempstead, 2004). Dichas proteínas se unirán a un tipo de receptor u otro en función de si el BDNF ha sido convertido a su forma madura (a partir de la correcta escisión del proBDNF haciendo que se separe de su pro-dominio) o si media su efecto como proBDNF (no hay escisión del pro-dominio y por lo tanto la fracción madura no queda libre), lo que llevará a la puesta en marcha de funciones biológicas no solo distintas, sino también contrapuestas (Teng et al., 2005). En concreto, el BDNF maduro se une al receptor tipo B (TrkB) contribuyendo a la mayoría de los efectos neurotróficos previamente descritos como la supervivencia neuronal y la potenciación sináptica (Kang & Schuman, 1995; Tanaka et al., 2008). Sin embargo, el proBDNF lo hace al receptor p75 induciendo la activación de procesos apoptóticos y neurodegenerativos (Chao, 2003). Es decir, la correcta escisión proteolítica de las pro-neurotrofinas (en este caso el proBDNF) juega un papel crucial en la regulación de la señalización del BDNF maduro en el SNC y en las acciones neurotróficas que produce (Lu, 2005).

En el caso del SNP Val66Met del gen *BDNF*, el cambio del aminoácido valina (Val) por el aminoácido metionina (Met) en la región 5' del proBDNF, podría contribuir a una producción excesiva de dicha pro-neurotrofina, que acabaría siendo tóxica para las neuronas, además de alterar la correcta expresión/producción del BDNF maduro al no separarse correctamente de su pro-dominio (Chen et al., 2004; Egan et al., 2003) (Figura 1.9). Así pues, uno de los objetivos de estudio de la presente tesis doctoral tiene en cuenta dicho proceso y cómo la alteración de la correcta maduración del BDNF puede propiciar cambios neurofisiológicos en la CF cerebral (ver capítulo 4).

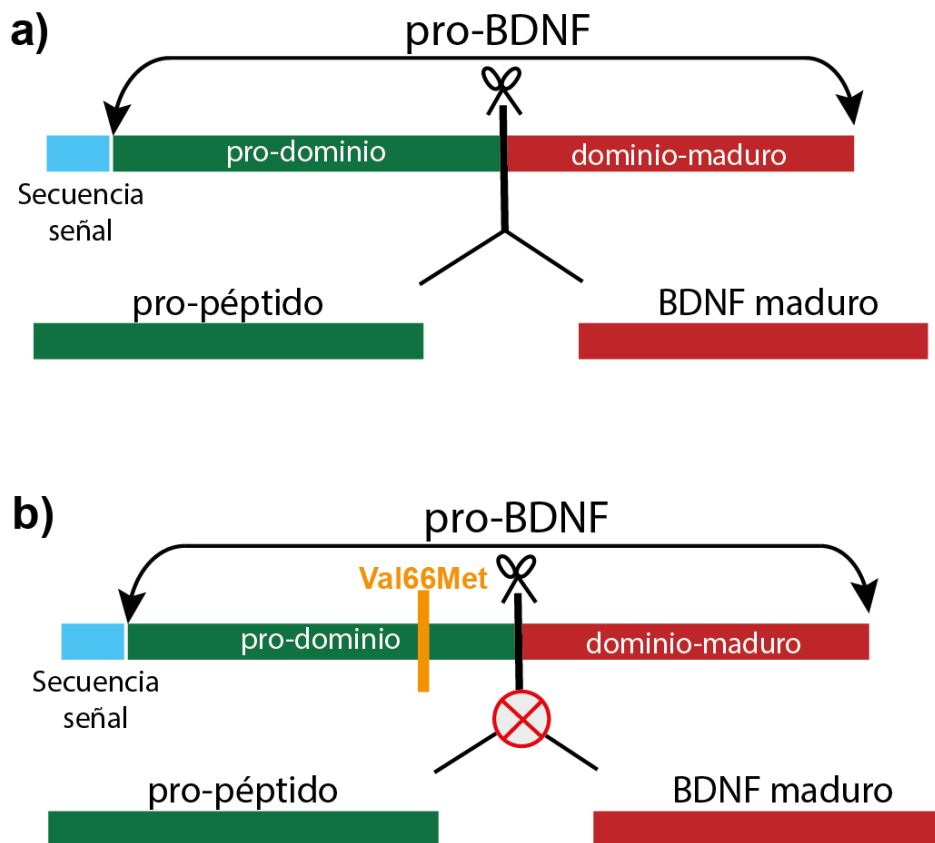


Figura 1.9. BDNF y SNP Val66Met. a) En condiciones normales la correcta excisión del proBDNF da lugar a la producción del BDNF maduro encargado de la mayoría de los efectos neurotróficos en el cerebro. b) La producción de un cambio de una Valina (Val) por una Metionina (Met) en el codón 66 del pro-dominio del proBDNF puede contribuir a que el BDNF no se libere correctamente evitando que éste lleve a cabo sus funciones neurotróficas características (Adaptado de Dieni et al., 2012).

1.8 Magnetoencefalografía y ritmos cerebrales

El cerebro humano es un sistema biológico enormemente complejo cuyo estudio ha suscitado siempre un gran interés (Roche & Commins, 2009). La neurona es su unidad funcional principal, contando con alrededor de entre 86 y 100 billones de ellas (Pelvig, Pakkenberg, Stark, & Pakkenberg, 2008). En paralelo al desarrollo tecnológico de las últimas décadas, han surgido una serie de técnicas de neuroimagen capaces de desentrañar el funcionamiento del cerebro desde una perspectiva nunca vista anteriormente. Entre ellas, la Magnetoencefalografía (MEG) es una técnica de neuroimagen funcional no invasiva que nos ha permitido acercarnos más al “cuándo”, “dónde” y “cómo” se produce el funcionamiento cerebral desde el aparente estado de reposo, pasando por la evaluación de diferentes procesos cognitivos (memoria, lenguaje,

percepción, etc.), hasta la detección de alteraciones en las oscilaciones cerebrales como consecuencia del padecimiento de diversas patologías neurológicas y/o psiquiátricas (Maestú, Ríos & Cabestrero, 2008). (Figura 1.10).



Figura 1.10. Sistema MEG Elekta Neuromag situado en el Centro de Tecnología Biomédica (Madrid).

La actividad electrofisiológica que registra la MEG deriva de los débiles campos magnéticos (del orden de femtoteslas; 100 millones de veces más pequeños que el campo magnético de la Tierra) generados por las corrientes eléctricas producidas fundamentalmente por las neuronas piramidales. Estas neuronas suponen alrededor del 80% de las neuronas glutamatérgicas y/o excitatorias de la corteza cerebral (el resto son interneuronas que poseen función gabaérgica o inhibitoria) y fueron descubiertas por Ramón y Cajal en 1888 (Ramón y Cajal, 1888). Al igual que el resto de neuronas, constan de soma (en este caso con forma de pirámide), axón y dendritas, aunque poseen una particularidad en lo que a las dendritas se refiere: tienen una dendrita apical bastante prolongada y multitud de dendritas basales más cortas que se van ramificando (Spruston, 2008). Es por ello que se las suele considerar como neuronas de proyección, es decir, envían información a células alejadas del área de donde se originan. Asimismo, se distribuyen de forma paralela las unas a las otras formando columnas corticales perpendiculares a las 6 capas horizontales que conforman el córtex cerebral (Lopes da Silva, 2013; figura 1.11).

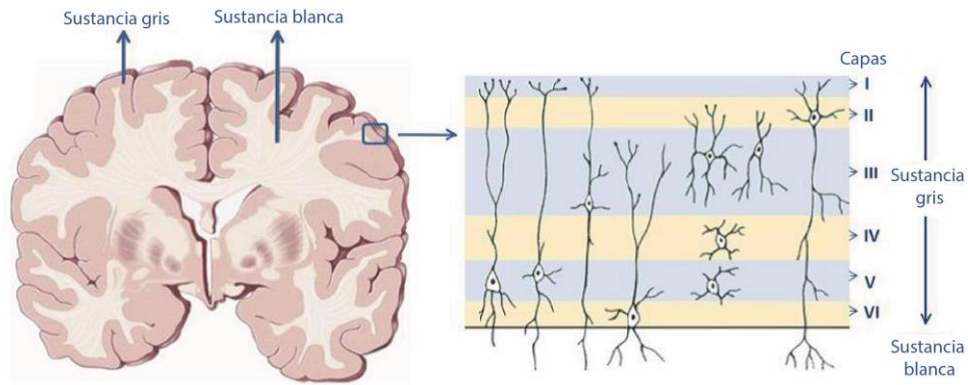


Figura 1.11. Capas de la corteza cerebral y distribución de las neuronas piramidales a lo largo de ella (Adaptado de Correas-Marín, 2017).

Por otro lado, la señal cerebral que capta la MEG desde el exterior del cuero cabelludo proviene de los potenciales postsinápticos que generan las dendritas apicales de las neuronas piramidales como consecuencia de la información recibida por otras neuronas. Éstos, en contraposición a los potenciales de acción, son lo suficientemente duraderos (decenas de milisegundos) como para favorecer la potenciación mutua de las corrientes iónicas, así como para facilitar una mayor probabilidad de sincronización temporal entre varias neuronas (Figura 1.12). Para obtener un campo magnético con una magnitud lo suficientemente grande como para ser detectado, se necesitan al menos 10^5 neuronas piramidales disparando conjuntamente (Buzsáki, Anastassiou, & Koch, 2012).

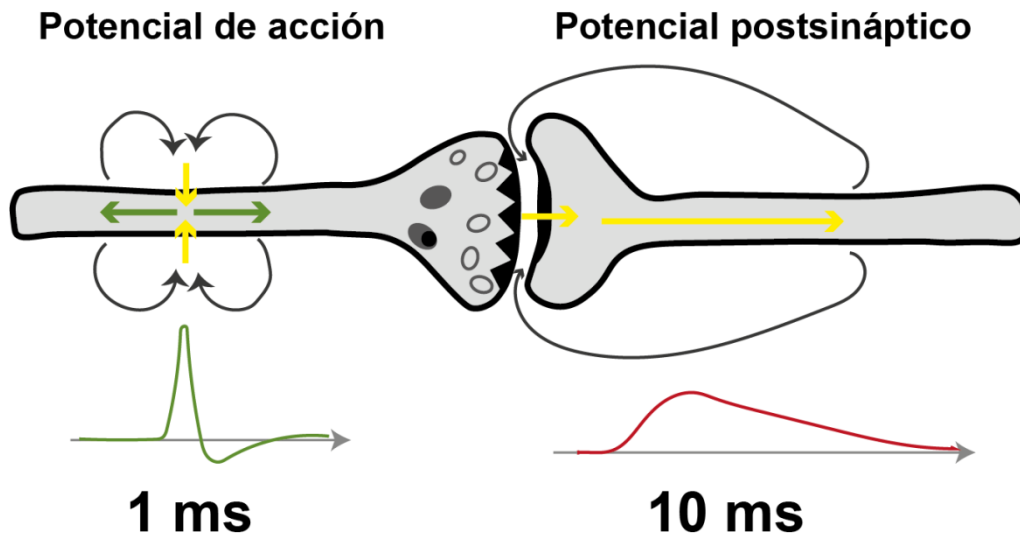


Figura 1.12. Potencial de acción y potencial postsináptico. Solamente los potenciales postsinápticos son lo suficientemente largos como para detectar un campo magnético en la superficie del cuero cabelludo (ver la figura 1.13 para una representación más clara sobre cómo se genera el campo magnético) (Adaptado de Correas-Marín, 2017).

La utilización de los campos magnéticos como medida de la actividad neuronal reside en sus propias características físicas. Es decir, no se van a ver apenas distorsionados por los tejidos que los rodean (meninges, cráneo y cuero cabelludo (Carretié, 2011), algo que por el contrario no ocurre con el EEG, ya que, en este caso, las distintas conductividades de los tejidos propician que el campo eléctrico se disperse. Este factor hace que la calidad de la señal MEG sea mejor (especialmente a frecuencias altas). Además, desde el mero punto de vista metodológico, la reconstrucción de las fuentes en el interior del cerebro que originan la señal MEG en el exterior del cráneo, es mucho más sencilla en el caso de la MEG, ya que el modelo de conducción no requiere de tanto detalle como en el EEG que ha de ser mucho más realista. Sin embargo, debido a que el campo magnético es perpendicular al sentido de la corriente eléctrica que lo ha originado, la MEG únicamente puede registrar los campos magnéticos asociados a las corrientes neuronales tangenciales a la superficie del cráneo, es decir, a las ocasionadas en los surcos cerebrales, siendo, por tanto, ciega a las corrientes radiales (figura 1.13). Esta limitación no se encuentra en el caso del EEG, lo que le hace sensible a ambos tipos de corrientes. Es por ello que ambas técnicas pueden ser consideradas complementarias a la par que abarcan una mayor y detallada recogida de información de la actividad cerebral (Liu, Dale, & Belliveau, 2002).

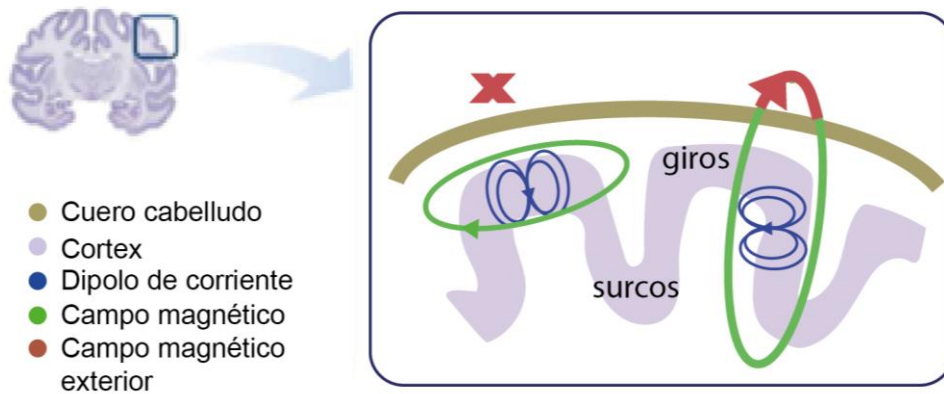


Figura 1.13. Orientación de los campos magnéticos en el cerebro. La MEG no registra las corrientes radiales (giros), solamente las tangenciales (surcos). (Adaptado de Niso-Galán, 2013).

La principal ventaja que tiene la MEG con respecto a otras técnicas de neuroimagen es su resolución temporal del orden de milisegundos (en tiempo real) así como una buena resolución espacial de milímetros (Baars & Gage, 2013; Pievani, de Haan, Wu, Seeley, & Frisoni, 2011). A su vez, tiene dos inconvenientes importantes: el ruido externo, que es de un millón a un billón de veces más intenso que la señal cerebral y que los sensores han de estar a temperatura superconductora (-269°C) para que se dé un funcionamiento óptimo de los mismos. Todo ello encarece notablemente los costes, ya que, en el primer caso, los registros de MEG han de hacerse dentro de una cámara aislada con un material especial (Mu metal) que ayude a desviar los campos magnéticos ambientales y, en el segundo caso, se precisa de helio en estado líquido con el fin de refrigerar los sensores MEG a la temperatura requerida para su correcto funcionamiento. Otros inconvenientes adicionales serían la falta de portabilidad, el alto precio de los registros o la existencia de pocos sistemas MEG en todo el mundo.

Oscilaciones

Las fluctuaciones de la actividad neuronal producidas en el momento en el que las neuronas disparan de manera sincronizada, dan lugar a los distintos tipos de ritmos cerebrales que se pueden registrar con la MEG o el EEG. Dichas oscilaciones se caracterizan por tener una frecuencia, amplitud y/o fase determinadas. La frecuencia

generalmente se refiere al número de ciclos por unidad de tiempo, la amplitud hace alusión a la altura, potencia o máxima energía de una onda y la fase tiene en cuenta la posición relativa de una onda u oscilación en un instante temporal (esta última característica es la que se explorará con mayor detalle en la presente tesis doctoral; ver apartado 1.9 y capítulos 4 y 5).

Hans Berger (1929), fue el primero en registrar esta actividad cortical mediante el uso del EEG y el que a su vez descubrió uno de los patrones oscilatorios más importantes y dominantes en el cerebro humano: el ritmo alfa (α , de 8-12 Hz). A partir de ahí, se identificaron otros ritmos cerebrales de interés y que podemos dividir principalmente en cinco bandas clásicas de frecuencia (figura 1.14; para una descripción más detallada de cada una de las bandas de frecuencia ver Capilla & Carretié, 2015):

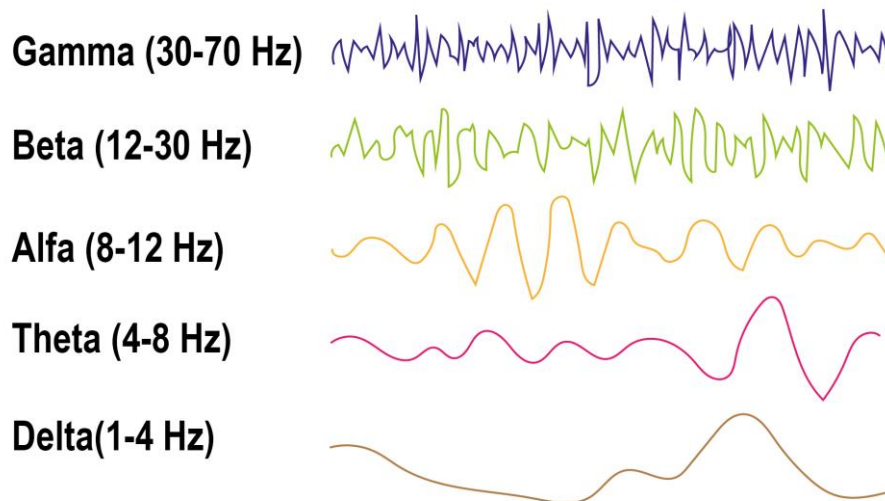


Figura 1.14. Ritmos cerebrales y definición de las bandas clásicas de frecuencia.

Delta (δ , 1-4 Hz): Las ondas δ son las oscilaciones cerebrales de mayor amplitud y, en el cerebro adulto sano, son típicas del sueño profundo (Buzsáki, 2006). De igual modo, es la actividad oscilatoria predominante durante los dos primeros años de vida, aunque va decreciendo a lo largo de la infancia. Aunque en estados de vigilia su presencia suele asociarse a diferentes patologías neurológicas como crisis epilépticas, lesiones o tumores cerebrales (Fernández-Bouzas et al., 1999), también parece tener un papel funcional en diversos procesos cognitivos como la atención, el cálculo mental o el

procesamiento sintáctico del lenguaje (Fernández et al., 1995; Harmony, 2013; Sauseng & Klimesch, 2008).

Theta (θ , 4-8 Hz): El ritmo theta es especialmente prominente en el hipocampo y estructuras límbicas adyacentes, por lo se le ha involucrado en la codificación y la recuperación de la memoria episódica y espacial (Hasselmo & Eichenbaum, 2005). Asimismo, dicha actividad también puede aparecer en estructuras frontales donde se la ha relacionado con la evaluación de los beneficios de una respuesta, la novedad ante un estímulo y el control cognitivo o comportamental (Cavanagh & Frank, 2014). Al igual que en el caso de la banda δ , también se encuentra presente en casos de epilepsia (Clemens, 2004).

Alfa (α , 8-12 Hz): El ritmo α se localiza sobre todo en regiones occipitales durante periodos de relajación, con los ojos cerrados, pero estando despierto. Es decir, se encarga de mantener *al ralenti* las regiones sensoriales en espera de estimulación, listas para la acción si ello fuera necesario (Pfurtscheller, Stancák, Neuper, & 1996). Más recientemente se le ha otorgado un papel más activo de inhibición del procesamiento de la información (Klimesch, Sauseng, & Hanslmayr, 2007; Lopes da Silva, 2013) así como una mayor participación en procesos cognitivos superiores como la atención y la memoria operativa (Palva & Palva, 2007).

Beta (β , 15-30 Hz): El ritmo β predomina durante el periodo de vigilia, se distribuye en regiones fronto-centrales y está involucrado tanto en la ejecución como la inhibición motora (Engel & Fries, 2010). Es decir, aparece cuando comienza el movimiento y disminuye al inicio de éste al igual que alfa disminuye o desaparece con la actividad propia de la región sensorial que lo genera (como por ejemplo al abrir los ojos). Además de su papel en el sistema motor, parece tener un grado de implicación importante en procesos de retroalimentación (top-down) hacia regiones corticales inferiores y subcorticales (Sauseng & Klimesch, 2008).

Gamma (γ , >30 Hz): Son las ondas de menor amplitud y mayor frecuencia. Estas oscilaciones han sido descritas en prácticamente todas las regiones cerebrales (Buzsáki & Wang, 2012) y están implicadas en procesos cognitivos superiores como el aprendizaje, la memoria o el procesamiento de la información (Jensen, Kaiser, & Lachaux, 2007). Parece ser que estas características junto con su participación en el

establecimiento de conexiones a corta y a larga distancia, las convierte en candidatas inmejorables para explicar la eficiencia de la comunicación neuronal (Başar, 2013).

Para concluir, y aunque se ha hecho una descripción de cada ritmo cerebral de forma individual, se ha de tener en cuenta que las neuronas tienen capacidad para oscilar en múltiples frecuencias, coexistiendo y cooperando entre sí en función de las diferentes funciones o estados cerebrales que se puedan desencadenar en un momento dado (Mantini, Perrucci, Del Gratta, Romani, & Corbetta, 2007).

En resumen, la medición de la actividad oscilatoria cerebral por medio de la MEG nos permite realizar un estudio no invasivo del funcionamiento del cerebro en tiempo real. Dependiendo de la hipótesis inicial de partida y/o de la metodología que se utilice, se obtendrá un tipo de información u otra. En la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo un análisis de la CF cerebral entre portadoras y no portadoras de determinados factores de riesgo genético en dos de los estudios propuestos (capítulos 4 y 5). En el siguiente punto se ofrece más información respecto a este procedimiento, así como la idoneidad de su estudio en estado de reposo (resting-state).

1.9 Conectividad Funcional en Estado de Reposo

Como se ha comentado en apartados previos, a lo largo del proceso de envejecimiento se producen cambios cognitivos, neurofisiológicos y estructurales (Borrás Blasco & Viñas Ribes, 2016). Sin embargo, no se sabe con certeza cuándo comienzan a producirse estos cambios sutiles y cómo dichos cambios pueden comenzar a observarse en ancianos “aparentemente sanos” que podrían estar en predisposición a desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. Así pues, con el fin de detectar la actividad neuronal y los cambios asociados a ésta, se han llevado a cabo multitud de estudios de neuroimagen durante la realización de diferentes tareas cognitivas, la percepción de estímulos y/o la actividad cerebral en estado de reposo (resting-state) (Proal, Álvarez-Segura, Iglesia-Vayá, Martí-Bonmatí, & Castellanos, 2011).

Durante muchos años, dichos estudios se han focalizado en la investigación de la segregación funcional, es decir, la localización e identificación de regiones cerebrales especializadas en una función específica. Sin embargo, esta forma de entender la organización y funcionamiento de nuestro cerebro ha ido evolucionando hacia otro tipo de enfoque: la integración funcional, donde nuestro cerebro es entendido como una red,

formado por regiones distribuidas en el espacio, funcionalmente conectadas y que comparten información entre ellas (Tononi, Sporns, & Edelman, 1994) (Figura 1.15).

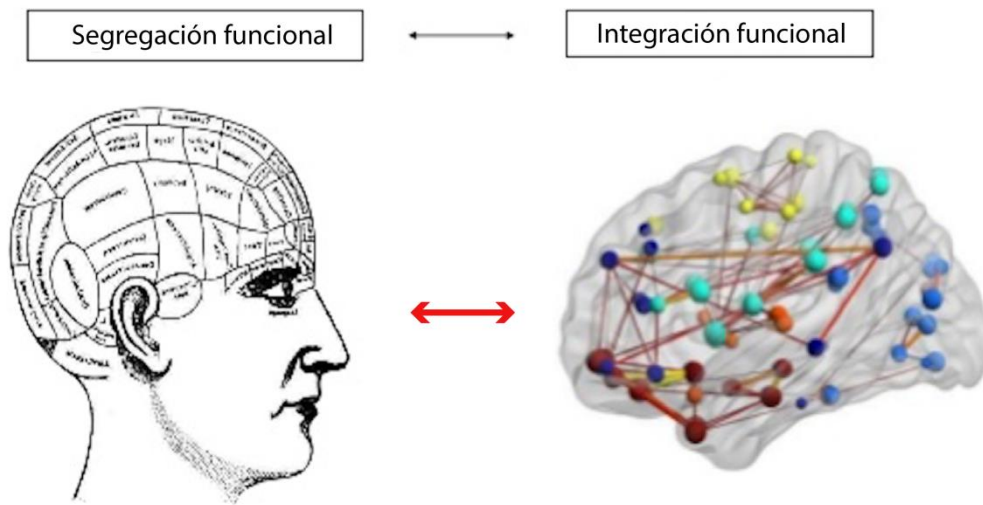


Figura 1.15. Imágenes ilustrativas de segregación (izquierda) e integración (derecha) funcional. Extraída y adaptada de <https://image.slidesharecdn.com/pintofscience2017fisabio-170520193551/95/pint-of-science-2017-fisabio-18-638.jpg?cb=1495309221>

De este modo y con la intención de comprender cómo las distintas regiones cerebrales se sincronizan y coordinan entre sí para llevar a cabo procesos cognitivos complejos, emerge el concepto de CF acuñado por Friston en 1994. La CF se define como la dependencia temporal de los patrones de actividad neuronal de regiones cerebrales anatómicamente separadas (Friston, 1994; Friston, 2001). Es decir, cuando se dice que dos regiones están conectadas/sincronizadas funcionalmente, se está haciendo referencia a una relación de dependencia estadística entre la actividad de los elementos en cuestión, independientemente de si están o no conectados estructuralmente (es decir, enlazadas por haces axonales).

Por otro lado, el estudio de la actividad del cerebro en resting-state se está erigiendo como una vía interesante del estudio de los procesos cognitivos. Diferentes investigaciones han confirmado que, durante el estado de reposo, la red cerebral, lejos de permanecer inactiva, muestra una enorme cantidad de patrones de activación espontáneos entre distintas regiones cerebrales (Buckner & Vincent, 2007; Greicius, Krasnow, Reiss, & Menon, 2003; Greicius, 2008). Así pues, la realización de registros

en estado de reposo supone una serie de ventajas como las siguientes (Babiloni et al., 2016; Proal, et al., 2011):

- No requiere la presentación de estímulos o la evaluación comportamental de los participantes. Simplemente se indica al individuo que se relaje (sin quedarse dormido) y no piense en nada en particular mientras se mide su nivel de actividad cerebral espontánea. Esto hace que se pueda aplicar a muchas poblaciones clínicas como pacientes con parálisis, afasias, deterioro cognitivo, EA, etc.
- Prácticamente no produce fatiga ni supone un estrés añadido más propio de la realización de determinadas tareas cognitivas.
- Se puede repetir cuantas veces se desee a lo largo del tiempo sin tener en cuenta el efecto del aprendizaje derivado de las tareas cognitivas. Esto no solo permite la reproductibilidad entre individuos, sino también a través de registros llevados a cabo en distintos laboratorios.
- Derivado de la posibilidad de hacer estudios longitudinales, puede servir como biomarcador de cambios funcionales en todas las etapas de la vida de una persona, así como para identificar diferencias en los circuitos funcionales de pacientes con determinadas patologías comparados con sujetos control.

En este sentido, muchas de las enfermedades del sistema nervioso central se caracterizan por alteraciones o cambios complejos de la actividad cerebral. Sin ir más lejos, la EA es considerada tradicionalmente como un síndrome de desconexión. Es decir, el desarrollo de la enfermedad genera daños en la conectividad entre los distintos sistemas neuronales (Delbeuck, Van der Linden, & Collete, 2003), donde las regiones más comúnmente afectadas son el cíngulo posterior, precúneo, córtex parietal, hipocampo y córtex prefrontal medial (Seeley, Crawford, Zhou, Miller, & Greicius, 2009).

La mayoría de los estudios en resting-state describen una menor CF en pacientes con EA que en ancianos sanos (ver por ejemplo Betzel et al., 2014; Demirtaş et al., 2017; Li et al., 2016). De hecho, éstos últimos ya presentan una disminución de la misma en comparación con adultos jóvenes (para una revisión ver Sala-Llloch, Bartrés-

Faz, & Junqué 2015). Asimismo, gran parte de los estudios de MEG y CF apoyan estos mismos hallazgos (Engels et al., 2017). En este caso, las bandas de frecuencia principalmente afectadas por esta disminución de la conectividad parecen ser alfa y beta (Stam & van Dijk, 2002; Babiloni et al., 2004; Engels et al., 2017), aunque dependiendo del mecanismo biológico subyacente sometido a estudio, podremos obtener otro tipo de resultados. Por ejemplo, en un trabajo llevado a cabo por Cuesta y colaboradores (2015), aquellos individuos portadores del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*, presentaron una disminución de la CF de largo alcance en la banda delta, donde tanto conexiones frontales como temporales se vieron especialmente comprometidas.

En la presente tesis doctoral, dada la naturaleza oscilatoria de las señales electromagnéticas cerebrales, las medidas de CF han sido realizadas mediante la aplicación del método de sincronización de fase (SF) o *Phase Locking Value en inglés* (PLV; Lachaux, Rodríguez, Martinerie, & Varela, 1999; Mormann, Lehnertz, David, & Elger, 2000), cuya fiabilidad test-retest ha sido recientemente constatada (Garcés, Martín-Buró, & Maestú, 2016). Como se comentó en el apartado 1.8, las oscilaciones cerebrales se caracterizan por tener una frecuencia, amplitud y/o fase determinadas. La fase tiene en cuenta la posición relativa de una onda u oscilación en un instante temporal. Por lo tanto, la SF hace alusión a una situación en la que las fases de dos oscilaciones cerebrales acopladas se sincronizan entre sí a pesar de que sus amplitudes puedan no estarlo, de modo que el desfase que pueda existir entre ellas sea constante (figura 1.16). Por ejemplo, dos relojes que marcan horas distintas pero que entre sí mantienen una diferencia constante de 3,5 horas. El PLV estima cómo se distribuye la fase relativa sobre el círculo unidad. Cuando existe una fuerte SF entre X e Y (con un desfase constante de 90° por ejemplo), la fase relativa ocupa una pequeña porción del círculo unidad, y, por lo tanto, el PLV tomará un valor próximo a 1. Si por el contrario los sistemas no están sincronizados (es decir, el desfase es aleatorio), la fase se extiende por todo el círculo unidad y el PLV toma valores bajos cercanos a 0 (Niso, Bajo, Castellanos, & Pereda, 2015) (figura 1.17). Esta medida de sincronización temporal entre dos oscilaciones cerebrales nos permite obtener información sobre cómo se transmite la información entre una región cerebral y otra, en tanto en cuanto los potenciales de acción encargados de llegar a la neurona/s postsinápticas de interés, no

solo lo hagan a la vez, sino también durante un rango de fase específico y constante que favorezca dicha comunicación neuronal (Fell & Axmacher, 2011; Fries, 2005).

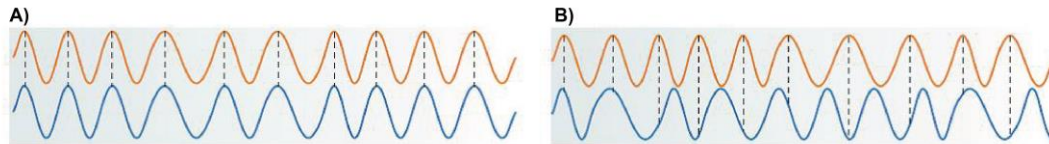


Figura 1.16. Sincronización (A) y ausencia de sincronización (B) de fase entre dos oscilaciones cerebrales (Extraída de Fell & Axmacher, 2011).

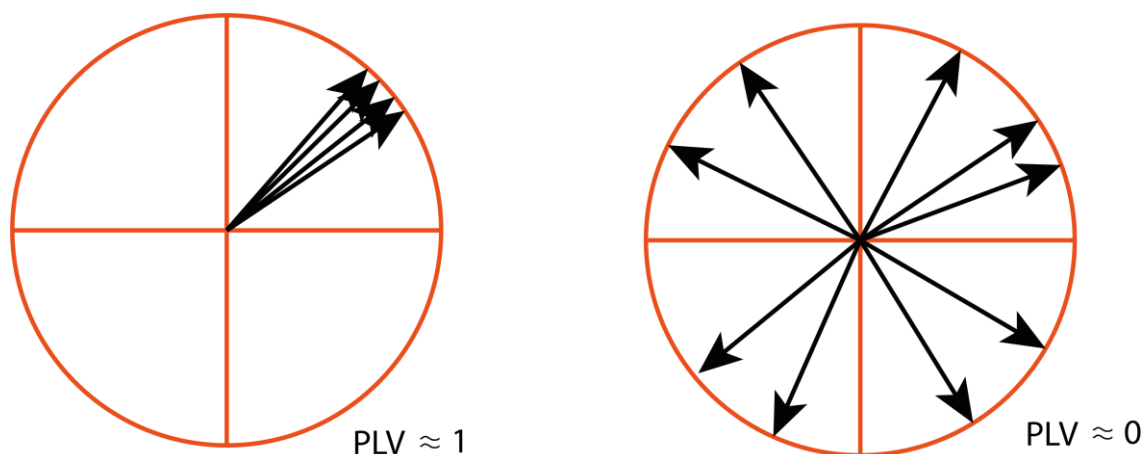


Figura 1.17. Distribución circular de la fase relativa para una señal acoplada con PLV próximo a 1 (derecha) o desacoplada en fase con PLV próximo a 0 (izquierda). (Adaptado de Niso, et al., 2015).

Los capítulos 4 y 5 muestran los resultados tras la aplicación de esta métrica entre mujeres ancianas sanas con factores de riesgo genéticos de EA, pero antes de concluir este capítulo a continuación se presenta una figura a modo de resumen de todos aquellos factores que podrían estar implicados en la progresión hacia la EA y que en mayor o menor medida han sido enumerados a lo largo de la presente introducción general (figura 1.18).

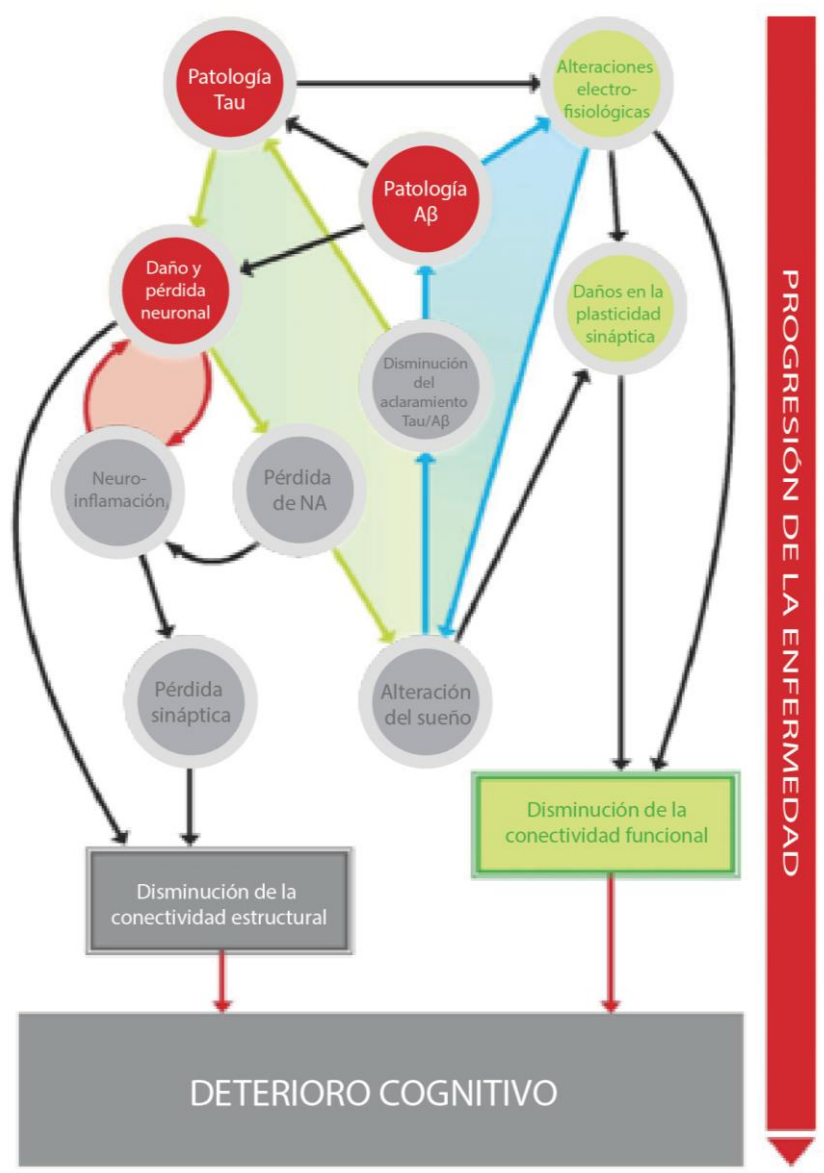


Figura 1.18. Esquema que demuestra la interacción compleja que se produce entre distintos factores y/o mecanismos fisiopatológicos relacionados con la progresión de la EA. La primera patología en emerger es la patología tau, que de acuerdo con los nuevos estadios de Braak, comienza en el Locus Ceruleus, en el tronco cerebral. El daño producido en estas neuronas resulta en una pérdida de señalización noradrenérgica (NA) lo que a su vez contribuye a un aumento de la inflamación cerebral y alteración del patrón de sueño. La inflamación cerebral mantenida (crónica), genera más daños neuronales, haciendo que ambos procesos se retroalimenten (zona sombreada en rojo). Por otro lado, la activación de la cascada inflamatoria produce también un aumento de la poda sináptica que junto con la degeneración neuronal contribuyen a una disminución de la conectividad estructural cerebral. La disrupción del sueño por su parte reduce el aclaramiento de la proteína A β y tau por parte del sistema glinfático (el sistema linfático del cerebro encargado de eliminar los productos de desecho), lo que hace que se acumule más proteína tau que a su vez causa más acúmulo de A β (zona sombreada en verde). Asimismo, tanto la patología tau como la amiloide producen alteraciones electrofisiológicas que afectan al funcionamiento neuronal mucho antes de que se produzca el proceso de neurodegeneración. En el caso de la proteína A β esto puede conllevar a mayor interrupción del sueño, que, como resultado, genera de

nuevas alteraciones en el correcto aclaramiento de A β y más acúmulo de la misma (zona sombreada en azul). Las alteraciones electrofisiológicas mencionadas anteriormente producen daños en la plasticidad sináptica que repercuten en una disminución de la coherencia/sincronización funcional entre regiones cerebrales. De forma combinada, tanto la disminución de la conectividad estructural como la funcional en la EA generan una pérdida de comunicación neuronal efectiva lo que en parte explica el deterioro o declive cognitivo manifiesto (Adaptado de Walsh et al., 2017).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS GENERALES

La presente tesis doctoral incluye 3 capítulos principales (Experimental Study I, Experimental Study II y Estudio Experimental III). El hilo conductor de todos ellos son los factores de riesgo genético de EA y cómo éstos pueden afectar al funcionamiento cognitivo y neurofisiológico de un grupo de ancianos cognitivamente intactos con el fin de poder establecer un abordaje precoz de la enfermedad.

Como se ha mencionado en la introducción general, además de los factores de riesgo de EA no modificables (como los genéticos), existen también factores de riesgo de EA modificables. En este sentido, la estimulación o el entrenamiento cognitivo emergen como posibles intervenciones no farmacológicas que, en mayor o menor medida, podrían llegar a ser modificables en función de las necesidades particulares de cada individuo.

Así pues, el primer estudio aborda la combinación de ambas posibilidades. Es decir, se tiene en cuenta un factor de riesgo no modificable, como la carga genética de los participantes y su posible efecto modulador tras la administración de un programa de entrenamiento cognitivo. De este modo las hipótesis de trabajo para el primer estudio serían las siguientes:

1. Después de la aplicación de un programa de intervención cognitiva existirá una mejoría en el rendimiento en la mayor parte de los participantes.
2. Tras el entrenamiento cognitivo, los no portadores del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* se verán más beneficiados que los portadores de dicho alelo de riesgo.
3. Un entrenamiento cognitivo enfocado en la mejoría del rendimiento en pruebas de memoria generará mayores puntuaciones en las pruebas neuropsicológicas relacionadas con la evaluación de este proceso cognitivo, pero además tendrá un efecto sobre otras funciones neuropsicológicas.

Por otra parte, los estudios experimentales II y III contemplan el efecto de la carga genética de los individuos sobre la CF cerebral. En ambos casos la muestra de estudio seleccionada está conformada por participantes del sexo femenino, otro de los factores de riesgo no modificables de la EA.

El estudio II trata de dilucidar si existe un patrón diferencial de CF para el SNP Val66Met del *BDNF*, gen relacionado con la plasticidad sináptica, diferenciación neuronal, proliferación de la arborización dendrítica y ramificación axonal. Las hipótesis de partida serían las siguientes:

1. Los portadores del alelo Met (Val/Met) tendrán una CF disminuida en comparación con los individuos pertenecientes al grupo Val/Val en una, varias o ninguna de las bandas de frecuencia clásicas estudiadas.
2. Asimismo, los Val/Met presentarán un menor rendimiento cognitivo que los Val/Val en las pruebas neuropsicológicas administradas.

En el estudio III, a partir del cálculo de una PRG de 3 SNPs pertenecientes a los genes *CLU*, *PICALM* y *CR1* se presupone que:

1. Aquellos individuos con una mayor PRG presentarán una menor CF en diversas bandas de frecuencia.
2. Asimismo cabría esperar que aquellos con una PRG mayor presenten un menor rendimiento cognitivo que los que tienen menores PRG a pesar de no rendir por debajo de la media normal en las pruebas neuropsicológicas.

La novedad que aportan los dos estudios de neuroimagen llevados a cabo en la presente tesis doctoral es la consideración del efecto de otros genes diferentes al *APOE*, ya que a pesar de que sigue siendo el factor de riesgo más determinante de la EAOE, se sabe que no todos los que son portadores del alelo $\epsilon 4$ desarrollan la enfermedad. Además, en ambos casos se aísla el posible efecto perjudicial que podría tener el ser portador de esta variante genética de riesgo al seleccionar únicamente mujeres homocigotas *APOE* $\epsilon 3\epsilon 3$ (primer caso), o estratificando la muestra en portadoras y no portadoras del mencionado alelo con el fin de poder examinar de forma independiente la influencia de la PRG de interés (segundo caso).

En resumen, el contenido de este trabajo trata de aunar 3 vertientes principales a tener en cuenta para llevar a cabo estudios de intervención y/o abordaje precoz de la EA en individuos ancianos que no presentan sintomatología asociada. Estas vertientes son la cognitiva, la neurofisiológica y la genética, siendo esta última el elemento que vertebra y unifica los posibles hallazgos derivados de dicho enfoque.

3. EXPERIMENTAL STUDY I

*APOE ε4 Modulation of Training Outcomes in Several Cognitive Domains in a Sample of Cognitively Intact Older Adults*²

3.1 Introduction

Nowadays, the study of treatments that could prevent cognitive decline is being fostered. In particular, cognitive training interventions have recently been demonstrated to yield positive results (Giuli, Papa, Lattanzio, & Postacchini, 2016; Giuli et al., 2017). However, there is considerable controversy regarding this issue (Martin, Clare, Altgassen, Cameron, & Zehnder, 2011; Papp, Walsh, & Snyder, 2009). There is scientific evidence that neuropsychological therapies in cognitively intact geriatric populations lead to improvements in various cognitive domains. For example, in a longitudinal study that used a training program in memory, reasoning, and processing speed in older adults without memory complaints, the results showed that the benefits were mainly produced in processing speed and reasoning and to a lesser extent in memory. Most importantly, the benefits persisted over two years (Ball et al., 2002; Willis & Caskie, 2013). Similarly, results from follow-up publications on the ACTIVE study that have been performed for up to 10 years, have reported that training in processing speed was associated with a reduced risk of developing dementia 10 years later (Edwardas, Xu, Clark, Ross, & Unverzagt, 2016). Other studies employing a multimodal intervention (which combines the promotion of healthy habits and cognitive training) have managed to improve or maintain cognitive functioning in older people at risk of dementia (Ngandu et al., 2015). Nevertheless, in a recent systematic review and meta-analysis, Lampit, Hallock and Valenzuela (2014) found that computerized cognitive training's overall effect on cognitive performance in healthy older adults was positive but small. In addition, it was ineffective for executive functions and verbal

² López-Higes, R.*, Rodríguez-Rojo, I. C.*, Prados, J. M., Montejo, P., Del-Río, D., Delgado-Losada, M. L., Montenegro, M., López-Sanz, D., & Barabash, A. (2017). *APOE ε4 Modulation of Training Outcomes in Several Cognitive Domains in a Sample of Cognitively Intact Older Adults*. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(2017), 1201–1215. DOI 10.3233/JAD-161014.

* These authors contributed equally to this work.

memory. Their analysis also showed that the efficacy varied by cognitive outcome and was mainly determined by design choices, that is, group-based training was effective, but the home-based modality was not. Interestingly, training more than three times a week was found to be counterproductive.

On another hand, there is growing interest in determining how certain genetic profiles could modulate cognitive functioning. In fact, it is well known that the genetic load could account for individual differences found between brain parameters and cognitive achievement (Jagust, 2009). As mentioned in section 1.5.2 of the general introduction, the $\epsilon 4$ allele of the *APOE* gene is the most recognizable genetic risk factor associated with Alzheimer Disease (AD) pathogenesis (Chartier-Harlin et al., 1994; Corder et al., 1993; Houlden et al., 1998; Paulson & Igo, 2011). This polymorphic gene is located on chromosome 19 and has 3 allelic variants ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$), which encode for three protein isoforms that differ only in the substitution of one or two amino acids (cysteine or arginine) at positions 112 and 158 (Hanlon & Rubinsztein, 1995; Mahley, 1988; Mahley & Rall, 2000). Apolipoprotein E (ApoE) isoforms have a variety of functions such as regulating brain lipid transport, neuronal signaling, glucose metabolism, neuroinflammation, and mitochondrial function (Liu et al., 2013) and they also differentially modulate the metabolism and aggregation of the amyloid- β peptide in the brain (Bu, 2009; Kim, Basak, & Holtzman, 2009). The carriage of the *APOE* $\epsilon 4$ allele has been related to an increased glial activation, oxidative stress, or neuronal injury (Laskowitz & Vitek, 2007), which could result in altered brain repair mechanisms and a less effective neural protection (Ariza et al., 2006). Furthermore, the ApoE $\epsilon 3$ is the normal and most common isoform among the population, and the ApoE $\epsilon 2$ has been linked to protection against AD and has been also suggested to have a positive influence on cognitive health (Suri et al., 2013).

Additionally, the negative effect of the *APOE* $\epsilon 4$ allele is not only confined to those suffering AD. It is also found in people with mild cognitive impairment (MCI), subjective cognitive decline (SCD), or in cognitively intact older adults. This indicates that its influence on cognitive functioning begins long before cognitive impairment becomes manifest (Caselli et al., 2009; Filippini et al., 2011; Izaks et al., 2011), even when people present a high cognitive performance profile (Bretsky, Guralnik, Launer, Albert, & Seeman, 2003). The $\epsilon 4$ allele has been mainly associated with impairments in episodic memory (Bondi et al., 1995; Honea, Vidoni, Harsha, & Burns, 2009;

Praetorius, Thorvaldsson, Hassing, & Johansson, 2013; Wilson et al., 2002) and executive functions (EF; Feng et al., 2015; Luck et al., 2014). A meta-analysis that evaluated the effect of the *APOE* genotype on cognition has also confirmed the negative effects of the $\epsilon 4$ allele on processing speed, executive functioning, and episodic memory in old age (Wisdom, Callahan, & Hawkins, 2011). However, in a previous meta-analysis, Small, Rosnick, Fratiglioni and Bäckman (2004) suggested that this effect was very small in that age group. In addition, studies that have taken into account both age at onset of AD and *APOE* $\epsilon 4$ carriage have found that, compared to late onset $\epsilon 4$ carriers, early onset noncarriers showed faster decline in language, attention, executive and visuospatial functioning. In other words, patients with AD exhibit cognitive decline in non-memory cognitive domains despite not having either risk factor (i.e., old age and $\epsilon 4$ allele carriage; Smits et al., 2015). In this sense, and closely related to the latter, it has been reported that the *APOE* $\epsilon 4$ allele could have an antagonistic pleiotropy, such that young $\epsilon 4$ carriers (age range 18-30 years) have shown favorable effects of this carriage status on cognitive performance (Jochemsen, Muller, Van der Graaf, & Geerlings, 2012; Mondadori et al., 2007) in contrast with the development of detrimental consequences as people age (Haan & Mayeda, 2010; Nilsson et al., 2006). An example of better cognitive performance in young adults with the *APOE* $\epsilon 4$ genotype is the study carried out by Stening and collaborators (Stening et al., 2016). They found, in contrast to the results obtained by the noncarrier group, that the carriage of the *APOE* $\epsilon 4$ allele had a positive impact on spatial tasks and on an episodic memory task with spatial components. However, other studies with young $\epsilon 4$ carriers have shown no *APOE* genotype-dependent differences in cognitive performance (Bunce, Anstey, Burns, Christensen, & Easteal, 2011; Filippini et al., 2009). This all translates into a panorama of great complexity, where multiple variables (e.g., not only biological but also environmental or social factors) could be affecting the final outcome in cognitive functioning.

To our knowledge, and directly related to the aim of the study, there are only a few papers examining how a risk genotype could moderate cognitive training effects, which ultimately might contribute to a beneficial or negative association with the particular condition of an individual. For example, Feng et al. (2015) assessed the interaction between the long-term effects of a multi-domain cognitive training and *APOE* genotype on cognitive function in community-dwelling older adults of Shanghai.

The sample population received 24 training sessions over 12 weeks. The authors found that cognitive training reduced the decline in processing speed over time regardless of the *APOE* genotype. However, carriers of the *APOE* $\epsilon 4$ allele presented reductions in EF over time, although training attenuated the $\epsilon 4$ negative effect on processing speed. In addition, they observed that *APOE* $\epsilon 2$ allele carriers also benefited from training, particularly in measures of EF and verbal memory. On another hand, Polito and co-workers (2015) employed 10 twice-weekly meetings to evaluate short-term efficacy of cognitive stimulation (CS) focused on a specific cognitive area that changed from session to session (executive reasoning, language-verbal fluency, semantic memory, etc.). They evaluated the influence of the *APOE* $\epsilon 4$ carrier status in cognitively healthy individuals with a family history of dementia (NDFAM) and in non-demented individuals with cognitive impairment (CI). As a result, they showed that CS was an effective treatment in cognitively healthy NDFAM (as shown in higher net gain in the Montreal Cognitive Assessment: MoCA), whereas it was less effective in individuals with CI. Moreover, they observed that the noncarriers in the cognitively healthy NDFAM group benefited from CS, as evidenced by improved cognitive performance (particularly, in visuospatial memory function), whereas the *APOE* $\epsilon 4$ carriers showed no significant improvement. Finally, a study carried out by Zehnder et al. (2009) measured the practice effect on cognitive performance by applying two neuropsychological assessment instruments in physically and mentally cognitively intact aged people (with a mean age of 70 years): initially at baseline and then, two years later. Their results indicated that the $\epsilon 4$ allele of the *APOE* gene had a negative impact on cognitive performance, notably on episodic memory tasks (such as immediate verbal learning and delayed recall). Furthermore, practice effects seen in carriers of the *APOE* $\epsilon 4$ allele were inferior in most tested areas to the effects found among the noncarriers.

The present study has an underlying hypothesis based on previous developments and considerations. In other words, the effect of cognitive training would differ depending on the *APOE* genotype, with $\epsilon 4$ carriers showing worse outcomes (or no effect) in different cognitive domains (memory, EF, and language comprehension) than the noncarrier group.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Participants

We selected 25 *APOE* $\epsilon 4$ carriers from a larger sample of healthy older adults who voluntarily participated in a study about healthy and pathological aging. All of them had a score higher than 24 points in the Mini-Mental State Examination (MMSE; Folstein, Folstein, & McHugh, 1975; Lobo et al., 1979; Lobo, Saz, & Marcos, 2002) and a score below 5 in the Yesavage Geriatric Depression Scale-Short Version (GDS-15; Sheikh & Yesavage, 1986). Then, we also selected *APOE* $\epsilon 4$ noncarriers matched in gender (15 women and 10 men in both groups), age, MMSE score, GDS-15, and overall cognitive reserve (estimated by a questionnaire; see materials below). All participants were assessed in the Center for Prevention of Cognitive Impairment of Madrid-Salud, nursing homes or day care centers in the city of Madrid (Spain). There were no significant group differences (*APOE* $\epsilon 4$ carriers vs. noncarriers) in any of the variables mentioned. Although it was not considered a criterion for participants' selection, we confirmed that there were no group differences in normalized hippocampal volume (see Table 3.1 for descriptive statistics related to all these variables). As *APOE* $\epsilon 4$ is considered a risk factor for cardiac disease, we explored a possible group difference in the number of cardiovascular (CV) diseases. Although there were more participants with CV diseases in the group of *APOE* $\epsilon 4$ carriers ($n = 7$) than in the noncarriers ($n = 2$), the difference did not reach statistical significance, $\chi^2(1) = 3.38, p = .06$.

The study complied with the ethical standards of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committees of the participant institutions.

Table 3.1. Descriptive statistics (mean and standard deviation) of variables in which groups were matched.

		<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
Age	<i>APOE</i> ϵ 4 carriers	25	71.64	5.715
	Noncarriers	25	71.68	5.647
MMSE	<i>APOE</i> ϵ 4 carriers	25	27.72	1.720
	Noncarriers	25	28.44	1.635
GDS-15	<i>APOE</i> ϵ 4 carriers	25	1.68	2.231
	Noncarriers	25	1.88	1.424
CRQ	<i>APOE</i> ϵ 4 carriers	25	13.76	4.447
	Noncarriers	25	14.04	4.430
NHV	<i>APOE</i> ϵ 4 carriers	22	.0047083	.00070081
	Noncarriers	20	.0050303	.00040590

Note. MMSE = Mini-Mental State Examination; GDS-15 = Geriatric Depression Scale - Short Version; CRQ = Cognitive Reserve Questionnaire; NHV: Normalized hippocampal volume.

3.2.2 Normalized hippocampal volume

A General Electric 1.5 Tesla magnetic resonance scanner was employed to acquire a T1-weighted image for each participant. A high-resolution antenna and a homogenization PURE filter (Fast Spoiled Gradient Echo sequence, TR/TE/TI = 11.2/4.2/450 ms; flip angle 12°; 1 mm slice thickness, 256x256 matrix and FOV 25 cm) were used. MRI images were processed with Freesurfer software (version 5.1.0) and its specialized tool for automated cortical and subcortical segmentation (Fischl et al., 2002). Hippocampal volumes were selected to match both groups. Hippocampal volume values were normalized with respect to the overall intracranial volume (ICV) to account for differences in head volume across participants.

3.2.3 *APOE* genotyping

Genomic DNA was extracted from 10 ml blood samples in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) of cognitively intact older participants. *APOE* haplotype was determined by analyzing single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs7412 and rs429358 genotypes with TaqMan assays, using an Applied Biosystems

7900 HT Fast Real Time PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA). A genotyping call rate over 90% per plate, sample controls for each genotype, and negative sample controls were included in each assay. Three well-differentiated genotyping clusters for each SNP were required to validate results. Intra- and interplate duplicates of several DNA samples were included.

3.2.4 Cognitive training program: UMAM

An extensive description of the cognitive training program (*Programa de la Unidad de Memoria del Ayuntamiento de Madrid*: UMAM; Montejo, Montenegro, Reinoso, De Andrés, & Claver, 2013) [English trans. Madrid City Council Memory Unit Program], can be found in Appendix. Briefly, the UMAM training program consisted of 30 sessions: 28 of them carried out within three months and two more considered as maintenance sessions. Each session lasted 90 minutes and was structured with its objectives, materials, and specific activities. The training was organized in groups of 14-16 people. The program was divided into four training areas: (1) Cognitive stimulation; (2) Memory concepts; (3) Management of forgetting everyday experiences; and (4) Meta-memory training.

3.2.5 Design

An extensive neuropsychological assessment (see *Materials* subsection below) of each participant was conducted at two moments: one at the beginning, immediately after recruitment (baseline: t_0), and six months later (endpoint: t_1). Once a participant decided to voluntarily participate in the study she/he was randomly assigned to one of the two conditions of cognitive training: immediate (between baseline and endpoint assessment, i.e., t_0 and t_1) or delayed (training after the endpoint assessment, i.e., after t_1). Thus, this study has a mixed factorial design, with genetic profile and cognitive training as between-subject variables, and the assessment time (baseline, endpoint) as the intra-subject variable.

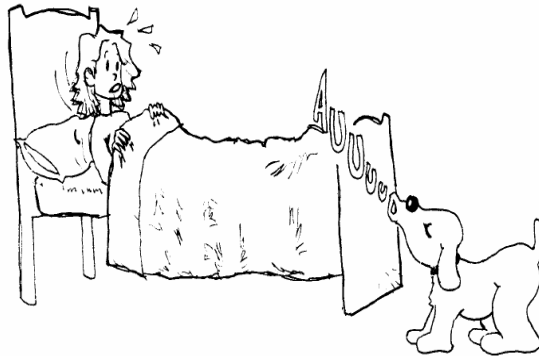
3.2.6 Materials

In order to establish the participants' cognitive status, they all underwent a neuropsychological assessment of three cognitive domains: memory, EF, and sentence reading comprehension. Memory was assessed with the Logical Memory and Word List from the Wechsler Memory Scale-III (WMS-III Spanish version; Wechsler, 2004), and EF were assessed by the Stroop test (Golden, 1978).

The ECCO_Senior test (*Exploración Cognitiva de la Comprensión de Oraciones*) [English translation: Cognitive Assessment of Sentence Comprehension], developed by López-Higes, Rubio, Martín-Aragoneses, Del Río, and Mejuto (2012), was used to assess grammatical reading comprehension. This test evaluates the thematic role assignment process (*who did what to whom*) through a simple verification task involving 36 sentence-picture pairs (visually presented) that are either congruent or incongruent. Incongruent items are syntactic or lexical foils. In syntactic foils (see figure 3.1), thematic roles are reversed in the picture with respect to the sentence statements, unlike in lexical foils (see figure 3.2), where there is a change in the picture with regard to an action, a person, or an object included in the sentence. Each type of sentence has specific features in two dimensions: propositional density (1 or 2 propositions) and syntactic complexity (defined by their matching the canonical word order in Spanish: canonical vs. non-canonical sentences). Most Spanish sentences follow the canonical Subject-Verb-Object (SVO) word order, so that the word located in the initial position has the greatest prominence as an argument and receives the thematic role of the agent. However, in Spanish, as in other languages, the linear position of the constituents can vary depending on discursive and contextual factors, as in passive sentences, where the correspondence between the linear order of words and the assignment of thematic roles is different from that of the canonical SVO order.

Figure 3.1. Example of a syntactic foil in the sentence comprehension test.

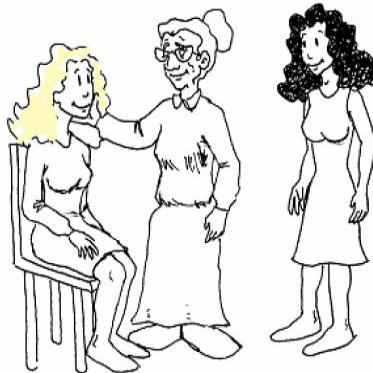
It was the dog that awakened the woman.



True or False?

Figure 3.2. Example of a lexical foil in the sentence comprehension test.

The woman kissed by the grandmother was sitting on a chair.



True or False?

Finally, to estimate cognitive reserve, participants completed the Cognitive Reserve Questionnaire (CRQ; Rami et al., 2011). The CRQ consists of 8 items that measure various aspects of the participants' intellectual activity: education, attainment of training courses, parents' education, lifetime occupation, musical training, and knowledge of languages. The CRQ also asks participants how often they carry out activities such as reading and practicing intellectual games (puzzles and chess).

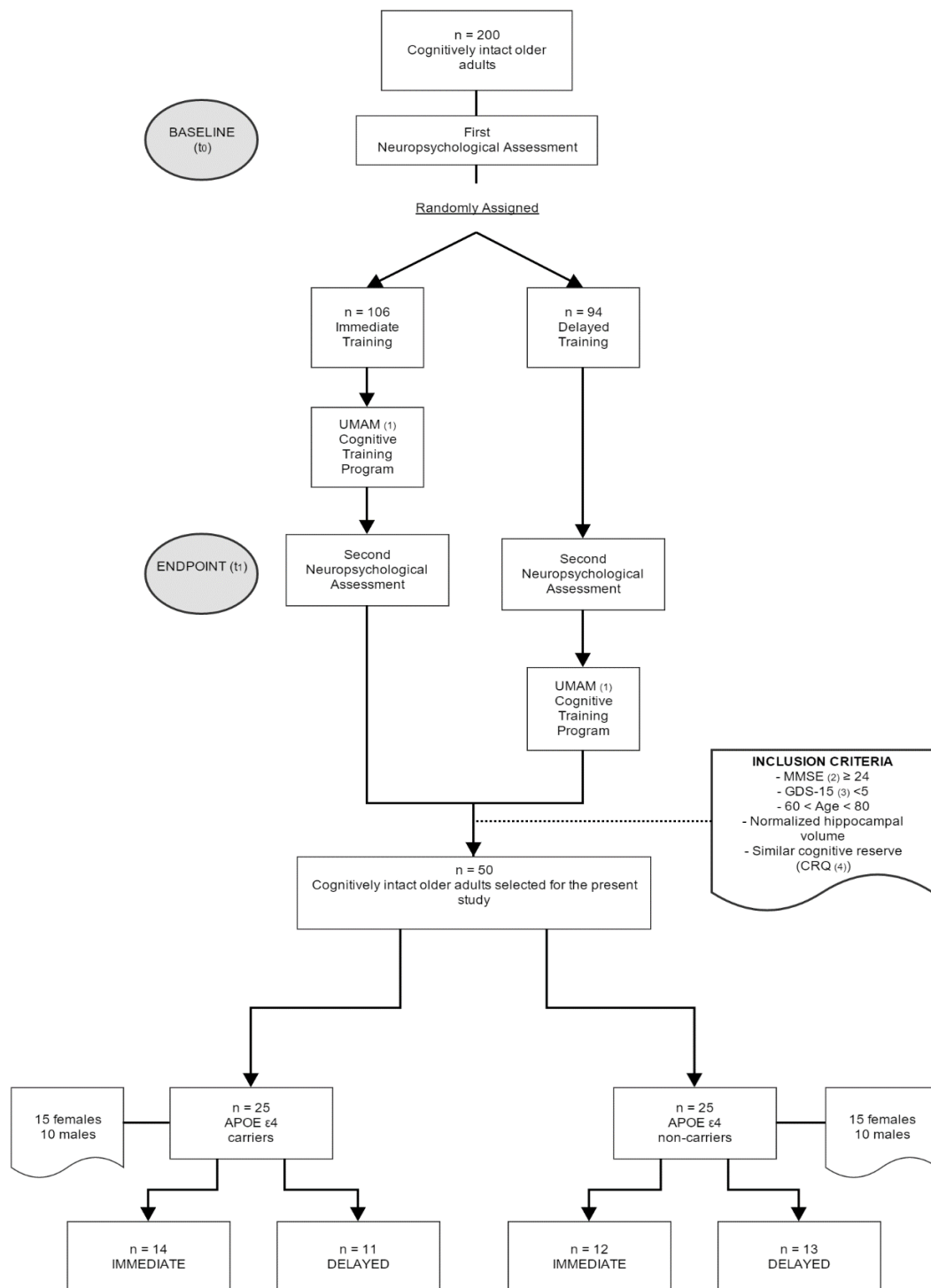
3.2.7 Procedure

Participants' neuropsychological assessment was conducted at two moments, one at the beginning, immediately after recruitment (baseline: t_0) and then six months after that (endpoint: t_1) by an experienced psychologist or psychiatrist in the Center for the Prevention of Cognitive Impairment of Madrid-Salud. Regarding the baseline phase, in the first session, participants completed the screening tests (MMSE, GDS-15), as well as the CRQ. In this session, participants were informed about the main goals of the study and signed an informed consent document. All the remaining neuropsychological and cognitive tests were carried out in two additional sessions, each lasting approximately 50 minutes. Although there was a block of tests for each session, the order of presentation of the tests was randomized in each session. Neuropsychological tests were administered and scored following the standard instructions provided in the users' manuals. At the endpoint, the same set of neuropsychological tests administered at baseline was used again to assess participants' performance in the same cognitive domains (memory, EF, and sentence comprehension).

3.2.8 Participant flow diagram

In order to clarify all the details regarding total sample recruitment, baseline assessment, random assignment to a training group, the UMAM program intervention, the endpoint measure, and the inclusion criteria finally used to select the 50 participants enrolled in the present study, we present the following flow chart (Figure 3.3).

Figure 3.3. Flow chart showing all phases in the global study.



Note: The flow chart shows how the selection of the 50 participants was carried out. APOE4 carriers selected for the study belongs to a set of 41 older adults having this allele in the total sample ($n = 200$). All participants were given two neuropsychological assessments: the first one at the baseline (0 months) and the second one at the endpoint (6 months). The UMAM cognitive training program was also applied to two different groups and in two different times: between the baseline and the endpoint period where both neuropsychological assessments took place (immediate group) and beyond the endpoint (delayed

group). (1) UMAM cognitive training program. (2) Mini-Mental State Examination. (3) Geriatric Depression Scale-Short Version. (4) Cognitive Reserve Questionnaire.

3.2.9 Statistical analysis

In the ECCO-Senior test sentence comprehension task, we obtained only two dependent measures (the number of correct responses) before analysis: (1) noncanonical sentences (NoCS) and (2) sentences with two propositions or verbs (S2P). We computed the interference index proposed by Chafetz and Matthews (2004) for the Stroop test.

The following primary dependent measures were selected for the study: Word List (WL) and Logical Memory (LM) performance in the delayed recall condition (WMS-III Spanish version), the Stroop interference index, participants' performance in NoCS and S2P from the ECCO-Senior test, and the GDS-15 score.

A mixed linear model (MLM) approach was used to test main effects of Genetic Profile (*APOE* ϵ 4 carriers vs. noncarriers), Cognitive Training (immediate vs. delayed), and their interactions. An additional (repeated measures) factor coding Assessment Time (baseline vs. endpoint) was introduced to account for effects attributable to cognitive training. MLMs have been previously recommended, as they can better account for individual variability in repeated measurements over time and, relative to other analytical methods, they also handle missing data more appropriately (Gueorguieva & Krystal, 2004). Our main goal was to explore a possible differential *APOE* genotype modulation effect of cognitive training benefits on memory, EF, and sentence comprehension. Thus, separate MLMs were estimated for each dependent variable, using IBM SPSS 20.0. In case of a significant interaction among the three previously mentioned factors (Genetic Profile x Cognitive Training x Assessment Time), the only relevant pairwise comparison would be that involving *APOE* ϵ 4 carriers and noncarriers with immediate training, since it is the main goal of the study. However, in that case we computed all post-hoc comparisons with the SPSS Generalized Linear Model procedure, simply using the difference between t_1 (endpoint) and t_0 (baseline) in the corresponding dependent variable for a specific condition (Genetic Profile x Cognitive Training) under consideration. We used the Bonferroni test, based on Student's t -statistic, which corrects the level of significance observed by the fact that

multiple comparisons are made. Effect sizes were estimated by means of partial eta-square (η^2_p).

3.3 Results

Table 3.2 shows descriptive statistics for each dependent measure by condition (Genetic Profile x Cognitive Training) at baseline (t0) and endpoint (t1).

Table 3.2. Neuropsychological scores of APOE $\epsilon 4$ allele carriers and noncarriers.

	<i>APOE ε4 carriers</i>		<i>APOE ε4 noncarriers</i>	
	BASELINE			
	Immediate training	Delayed training	Immediate training	Delayed training
	<i>M (SD)</i>	<i>M (SD)</i>	<i>M (SD)</i>	<i>M (SD)</i>
WMS-III: Words delayed recall	5.93 (3.91)	4.09 (2.62)	5.67 (2.27)	6.08 (3.70)
WMS-III: LM Topics delayed recall	10.00 (3.57)	9.64 (3.98)	10.50 (2.15)	10.85 (2.51)
Stroop Interference index	2.91 (5.33)	0.14 (5.08)	7.58 (8.22)	7.73 (10.84)
ECCO-Senior: NoCS	14.42 (2.34)	14.20 (1.75)	13.75 (2.56)	14.08 (1.92)
ECCO-Senior: S2P	15.21 (2.54)	14.90 (1.59)	13.91 (2.77)	14.41 (2.71)
GDS-15	1.50 (2.34)	1.91 (2.16)	1.92 (1.38)	1.85 (1.52)
	ENDPOINT			
WMS-III: Words delayed recall	7.85 (3.50)	5.63 (3.15)	7.08 (2.71)	8.50 (3.50)
WMS-III: LM Topics delayed recall	11.23 (2.58)	9.25 (2.60)	11.33 (2.06)	12.67 (0.86)
Stroop Interference index	8.12 (4.09)	-0.10 (6.12)	5.89 (8.46)	8.49 (11.67)
ECCO-Senior: NoCS	14.69 (2.35)	15.14 (1.77)	15.50 (1.77)	14.18 (2.60)
ECCO-Senior: S2P	15.53 (2.66)	15.28 (2.05)	16.20 (1.54)	14.45 (2.69)
GDS-15	1.64 (2.13)	1.44 (1.59)	0.67 (0.88)	1.20 (1.62)

Note. APOE $\epsilon 4$ = Apolipoprotein E epsilon 4; LM = Logical Memory; ECCO = Cognitive Assessment of Sentence Comprehension; NoCS: Noncanonical sentences; S2P: Sentences with two propositions; GDS-15 = Geriatric Depression Scale-Short Version.

3.3.1 APOE $\epsilon 4$ modulation of training outcomes in memory and EF selected measures

Regarding results obtained for dependent memory measures, the analysis revealed that the only factor that had an effect on participants' performance in WL and LM was Assessment Time (see Table 3.3). Memory measures were higher in t_1 than in t_0 (with the exception of one condition in which they were almost equal).

With respect to the Stroop interference index (see Table 3.3) the results pointed out that APOE $\epsilon 4$ noncarriers had greater inhibition control than the carriers, but no other effect reached statistical significance.

Table 3.3. Mixed Linear Model results in memory and EF domains.

Dependent variable	Effect	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	η^2_p
List of Words delayed recall (WMS-III)	Genetic profile	.783	1, 49.193	.381	
	Cognitive training	.709	1, 49.193	.404	
	Assessment time	26.041	1, 43.524	.000	.358
	Genetic profile X Cognitive training	1.892	1, 49.193	.175	
	Genetic profile X Assessment time	.114	1, 43.524	.738	
	Cognitive training X Assessment time	.001	1, 43.524	.979	
	Genetic profile X Cognitive training X Assessment time	.033	1, 43.524	.858	
Logical Memory of Topics delayed recall (WMS-III)	Genetic profile	3.176	1, 47.626	.081	
	Cognitive training	.044	1, 47.626	.835	
	Assessment time	4.522	1, 44.385	.039	.076
	Genetic profile X Cognitive training	1.405	1, 47.626	.242	
	Genetic profile X Assessment time	.657	1, 44.385	.422	
	Cognitive training X Assessment time	.112	1, 44.385	.740	
	Genetic profile X Cognitive training X Assessment time	1.203	1, 44.385	.279	
Stroop Interference index	Genetic profile	4.561	1, 50.392	.038	.109
	Cognitive training	.906	1, 50.392	.346	
	Assessment time	1.390	1, 44.019	.245	
	Genetic profile X Cognitive training	2.293	1, 50.392	.136	
	Genetic profile X Assessment time	3.354	1, 44.019	.074	
	Cognitive training X Assessment time	.376	1, 44.019	.543	
	Genetic profile X Cognitive training X Assessment time	2.574	1, 44.019	.116	

3.3.2 *APOE ε4 modulation of training outcomes in language comprehension*

In ECCO's noncanonical sentences, the analysis revealed that there was a significant main effect of Assessment Time, as well as a significant interaction between Genetic Profile x Cognitive Training x Assessment Time (see Table 3.4). Post-hoc comparison between *APOE* ε4 carriers and noncarriers who had received immediate cognitive training did not reach statistical significance. None of the remaining pairwise comparisons were significant. In sentences with two propositions, there was also a significant main effect of Assessment Time and a significant interaction among the three factors (see Table 3.4). Post hoc comparisons between conditions of interest (i.e., *APOE* ε4 carriers and noncarriers who had received immediate cognitive training), showed that there was a benefit in *APOE* ε4 noncarriers in sentence comprehension scores after training, whereas in the carriers, $t_1 - t_0$ differences were close to zero ($I - J = -2.47$; standardized error = 0.895, Bonferroni $p = .035$, Wald 95% CI [-4.22, -0.71], $\eta^2_p = .212$). Results in post-hoc comparisons also revealed for these items (S2P) that there was an effect of cognitive training (immediate vs. delayed) in *APOE* ε4 noncarriers' group: $I - J = 2.70$, standardized error = 0.930; Bonferroni $p = .022$, Wald 95% CI [0.87, 4.52].

Table 3.4. Mixed Linear Model results in sentence comprehension.

Dependent variable	Effect	<i>F</i>	<i>Df</i>	<i>p</i>	η_p^2
NoCS	Genetic profile	.239	1, 49.204	.627	
	Cognitive training	.086	1, 49.204	.770	
	Assessment time	6.528	1, 44.724	.014	.148
	Genetic profile X Cognitive training	.602	1, 49.204	.442	
	Genetic profile X Assessment time	.165	1, 44.724	.686	
	Cognitive training X Assessment time	.425	1, 44.724	.518	
	Genetic profile X Cognitive training X Assessment time	4.665	1, 44.724	.036	.127
S2P	Genetic profile	.597	1, 49.415	.443	
	Cognitive training	.570	1, 49.415	.454	
	Assessment time	6.517	1, 45.247	.014	.148
	Genetic profile X Cognitive training	.225	1, 49.415	.637	
	Genetic profile X Assessment time	1.644	1, 45.247	.206	
	Cognitive training X Assessment time	2.795	1, 45.247	.101	
	Genetic profile X Cognitive training X Assessment time	4.453	1, 45.247	.040	.117

Note. NoCS: Noncanonical sentences in the ECCO-Senior; S2P: sentences with two prepositions in the ECCO-Senior.

3.3.3 Could *APOE* $\epsilon 4$ be related to training outcomes in mood?

Considering that some authors have reported apparent collateral benefits of cognitive training programs in mood, we also explored the possible modulation effect of *APOE* $\epsilon 4$ carriage on training outcomes in this domain. When GDS-15 scores were considered, there was a main effect of assessment time, an interaction between Genetic Profile and Assessment Time, and finally, a significant interaction among the three variables included in the analysis (see Table 3.5). As in the previous subsection, we computed a planned post-hoc comparison between *APOE* $\epsilon 4$ carriers and noncarriers who had received immediate cognitive training. Results revealed a positive effect of cognitive training on GDS-15 scores in the group of *APOE* $\epsilon 4$ noncarriers (negative difference) and differences close to zero in the *APOE* $\epsilon 4$ carriers: $I - J = 1.39$; standardized error = 0.418; Bonferroni, $p = .005$, Wald 95% CI [0.57, 2.21], $\eta_p^2 = .326$. No other post-hoc comparison reached statistical significance.

Table 3.5. Mixed Linear Model results in GDS-15.

Dependent variable	Effect	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	η_p^2
GDS-15	Genetic profile	.110	50.469	.741	
	Cognitive training	.035	50.469	.853	
	Assessment time	16.441	48.217	.000	.281
	Genetic profile X Cognitive training	.077	50.469	.783	
	Genetic profile X Assessment time	4.392	48.217	.041	.072
	Cognitive training X Assessment time	.284	48.217	.597	
	Genetic profile X Cognitive training X Assessment time	5.452	48.217	.024	.118

Note. GDS-15 = Geriatric Depression Scale-Short Version.

3.4 Discussion

In this study, we examined in a sample of cognitively intact older adults whether cognitive training benefits may be modulated by the carriage of the *APOE* $\epsilon 4$ allele, the most important genetic risk factor for late-onset AD. For this purpose, several cognitive domains such as memory performance, EF and language comprehension were differentially explored.

Regarding the effects of genetic profile on cognitive training outcomes in the domain of memory, the results obtained revealed that this factor did not modulate training benefits in any of the memory measures considered in the study. Thus, the UMAM program was not efficacious in the delayed recall measures in either of the two groups assessed (*APOE* $\epsilon 4$ carriers and noncarriers). This contradicts a number of studies that have shown the benefits of cognitive training in memory. In fact, the possibility of memory empowerment and compensation observed in several studies (Gámiz & Gallo, 2011) has served as a justification for the training programs and cognitive interventions developed in recent years (Tardif & Simard, 2011). For example, Novoa, Juárez, and Nebot (2008) found a positive effect on immediate and delayed memory in 8 of the 9 studies they reviewed. Actually, most of these studies applied a similar length of their groups' training sessions as the ones that we administered in the UMAM cognitive training program (i.e., one and a half hour each). Additionally, Martin et al. (2011) conducted a systematic review of the cognitive training intervention effects on various cognitive functioning domains (i.e. memory, EF,

attention, and processing speed), finding that, versus a non-treatment control condition, cognitively intact older adults receiving cognitive training significantly improved their immediate and delayed verbal recall scores.

Our results also contradict those obtained by Zehnder et al. (2009) which indicated that practice effects in *APOE* $\epsilon 4$ allele carriers were inferior in most tested areas compared to the effects found in the noncarriers, especially in episodic memory functions (immediate verbal learning and delayed recall).

With respect to the Stroop interference index, the results simply showed a main global effect of genetic profile. This means that *APOE* $\epsilon 4$ noncarriers had greater inhibition efficacy than *APOE* $\epsilon 4$ carriers, but this factor did not modulate the cognitive training effects. Accordingly, our pattern of results in memory and EF measures altogether contrast with other previous studies showing cognitive training benefits in these domains. For example in their systematic review and meta-analysis, Kelly et al. (2014) explored the impact of cognitive training and mental stimulation on the cognitive and everyday functioning of cognitively intact older adults. Their meta-analysis outcomes revealed that, compared to active controls, training improved cognitively intact older adults' performance on measures of EF (i.e., working memory, processing speed, and composite measures of cognitive function) and memory (i.e., face-name recall, immediate recall, paired associates), but only when comparison was made to the non-intervention condition; and finally, cognitive training also contributed to improve their subjective cognitive function. However, our findings regarding this issue (i.e., the memory and EF domains) are more in line with the results presented by Lampit and co-workers in their meta-analysis (2014), which have already been briefly described in the introduction. The lack of finding analogous results according to much of the literature on this topic could be due to the fact that, in our study, all participants (*APOE* $\epsilon 4$ carriers and noncarriers) were independent older adults with no signs of cognitive deterioration or depression and they were matched in different key variables, such as, for example, hippocampal volume. Bearing these considerations in mind, it was more difficult to find group differences than in other studies where the groups were less evenly matched.

On another hand, in relation to the sentence comprehension test (ECCO-Senior) outcomes, we observed significant differences between the endpoint and the baseline measures in sentences with two propositions, but only in the group of noncarriers who

received immediate training (reaching a low-moderate effect size). On the contrary, *APOE* $\epsilon 4$ carriers with immediate cognitive training did not exhibit any positive effect of treatment on this domain. This means that cognitive training did not produce any benefit for *APOE* $\epsilon 4$ carriers in sentence comprehension. The triple interaction Genetic Profile x Cognitive Training x Assessment Time explained 12% of the total variance of participants' performance in complex sentences. As we mentioned in the results, we have observed a positive effect of cognitive training on S2P's comprehension scores but restricted to noncarriers, that is, a significant improvement from t_0 (baseline) to t_1 (endpoint) in those older adults having immediate training in comparison with peers with delayed training.

To our knowledge, the present study is the first one to report the influence of *APOE* $\epsilon 4$ carriage status on the efficacy of cognitive training in healthy older individuals' sentence comprehension, measured as a gain in simple picture-sentence verification performance. Interestingly, the UMAM program was not explicitly designed to improve language comprehension in older citizens but our results indicate that it produces benefits in this domain, which was not assumed to be directly trained. This result contrasts with some evidence reported in reviews like the one conducted by Novoa et al. (2008), in which no pattern of results was found suggesting transference from one domain to another. Specifically, working memory and attentional/interference control tasks have been utilized in training studies, as they constrain higher order cognitive functioning (Shipstead, Redick, Engle, & 2010). These tasks can predict success in other tasks, ranging from reading comprehension (de Jonge & de Jong, 1996) to reasoning and problem-solving (Buschkuehl & Jaeggi, 2010; Jaušovec & Jaušovec, 2012; Morrison & Chein, 2011). In this sense, the study conducted by Jaeggi, Buschkuehl, Jonides and Perrig (2008) revealed that working memory training (which engages executive processes such as inhibition control, monitoring, updating, and dual-task management) led to transfer, improving measures of fluid intelligence. However, several other studies have failed to find transfer (Redick et al., 2013; Salminen, Strobach, & Schubert, 2012), which suggests controversy about this issue. Regarding the language comprehension results, the UMAM program includes activities related to vocabulary, reading texts, and following instructions, which are all closely related to written language comprehension. This intrinsic feature can lead to positive training outcomes associated with sentence comprehension skills. For example, the UMAM

program includes the PQRST method (Preview + Question + Read + Self-recitation + Test; Robinson, 1970; Montejo & Montenegro, 2006) to work with texts. So, it might be hypothesized that this procedure, which implies an active reading strategy, could have had a positive effect on sentence comprehension.

It should also be noted that we observed an unintended effect on cognitive training outcomes in older peoples' scores on the GDS-15 related to the genetic profile modulation. Our results showed that a significant reduction at the endpoint in this test was only confirmed in the group of *APOE* $\epsilon 4$ noncarriers who received cognitive training immediately (the post-hoc contrast reached a moderate effect size). In this case, the triple interaction Genetic Profile x Cognitive Training x Assessment Time explained about 12% of the total variance of participants' scores on the GDS-15. *APOE* $\epsilon 4$ carriers did not show any benefit from training in this domain. These findings are completely consistent with those recently obtained by Hill et al. (2016). However, considering that this scale is mainly used for screening, we must be cautious when interpreting this collateral training effect on mood, as all subjects had normal scores on the GDS-15 (that is, between 0 and 5). Therefore, future research should assess mood and psychological well-being using the most appropriate scales for this purpose, and always considering the modulating effect of social support.

In conclusion, the present study revealed that the genetic profile modulates cognitive training outcomes in complex sentence comprehension, and possibly, in mood, two domains that were not directly trained or included as specific goals of the administered cognitive intervention program.

3.4.1 Limitations and future directions

The evidence presented here highlights the importance of public policies directed at keeping cognitively intact older adults mentally active through specific training programs.

However, our sample was somewhat small, although the groups were quite restrictively matched in different variables, such as hippocampal volume. As it has been shown that carriers of the *APOE* $\epsilon 4$ allele are more susceptible of presenting reductions in this cerebral region (Mayeux, Small, Tang, Tycko, & Stern, 2001; Gispert et al., 2015; Pievani et al., 2011b; Tang et al., 2015), the genetic profile differences found in

our study could be more exclusively confined to the cognitive training effects. This would support the notion that some populations with certain positive characteristics could benefit from cognitive training despite being at-risk carriers for a given gene. Moreover, our *APOE* $\epsilon 4$ carrier group might be considered as a prodromic AD sample, although they did not suffer memory or global cognitive loss at the time of evaluation.

Another possible limitation of the study is related to the fact that we only studied the impact of a single, isolated gene. There is currently increasing focus on the interaction among genes. In this sense, it has been shown that multiple genetic influences and cognitive outcomes may more accurately predict cognitive performance—or impairment—than the effect of a single, isolated gene. For example, besides the *APOE* gene, the catechol-O-methyl transferase (*COMT*) or the brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) have been linked to cognitive decline or to abilities that could contribute to this synergistic effect (Das et al., 2014; Laukka et al., 2013; Lanni et al., 2012; Ji et al., 2014; Wollam et al., 2015; Raz, Rodrigue, Kennedy & Land, 2009). In addition, not just the interaction among genes should be considered, but also their possible antagonistic pleiotropic effect throughout the lifespan (Jochemsen et al., 2012; Mondadori et al., 2007; Haan & Mayeda, 2010; Nilsson et al., 2006). All of this raises environmental influence as a modulation of gene expression and the need to carry out longitudinal studies in order to better understand the genetic implications in cognitive abilities in old age, as well as across the entire lifecycle.

In addition, as we have pointed out in the discussion section, the UMAM program includes activities related to reading comprehension. So, in this sense, benefits of training in the language domain could be considered near transfer effects. Nevertheless, the absence of training benefits on memory or EF should be controversial. That is why future studies have also to explore in which conditions those domains might be strong and positively influenced by cognitive training.

On the other hand, our results could have a tentative explanation if one considers that *APOE* $\epsilon 4$ carriers have a specific cognitive profile characterized by a greater neural activation (as happens in older adults with SCD; see for example (Maestú et al., 2011), in order to compensate their incipient cognitive problems. As mentioned in the introduction, this greater neural activation could be due to the negative effects that the *APOE* $\epsilon 4$ carriage seems to produce in the brain (e.g. increased glial activation, oxidative stress, or neuronal injury (Laskowitz & Vitek, 2007), which could result in

altered brain repair mechanisms and in a less effective neural protection. Thus, those carriers of the *APOE* $\epsilon 4$ allele could possibly need to recruit additional neural networks or resources to give response to task demands involved in their daily lives. This would be made for the purpose of balancing this hypothetical brain disruption, although sometimes this over-activation of the brain circuitry could still remain ineffective (Logan, Sanders, Snyder, Morris, & Buckner, 2002; Reuter-Lorenz & Cappell, 2008). In other words, we hypothesize that despite the greater neural activation that the *APOE* $\epsilon 4$ allele carriers could suffer to cope with task demands, they are not able to benefit themselves from cognitive training. Regarding the *APOE* $\epsilon 4$ noncarriers, an extra recruitment of additional or alternative neural networks would not be necessarily required since it is assumed that they would not present “the same brain damages” as the ones attributed to the carrier group. On the contrary, they have obtained positive results from the cognitive training intervention which could be also presumable to produce neural network reorganizations or even new connections. However, we’re not able to elucidate why despite training several cognitive domains (e.g. memory, executive functioning, etc.), the *APOE* genotype modulation has been mainly restricted to the sentence comprehension area. In any case, we should bear in mind that this is only a speculative explanation on how the *APOE* $\epsilon 4$ allele could modulate the intervention effects and this might be another line of future research which could also be supported by neuroimaging tests.

In summary, future studies should promote the inclusion of all of these aspects, which may contribute to the improvement of our comprehension on how genetic mechanisms interact with cognitive processes. All of this has the ultimate goal of determining how to use this knowledge to conduct for example, more appropriate cognitive neurorehabilitation therapies.

4. EXPERIMENTAL STUDY II

BDNF Val66Met polymorphism and gamma band disruption in resting state brain functional connectivity: A Magnetoencephalography study in cognitively intact older females³

4.1 Introduction

Over the last two decades, the interest in exploring candidate genes related to cognitive and brain aging has significantly increased (Kennedy et al., 2014). The Brain Derived Neurotrophic Factor (*BDNF*) is one of the genes involved in the aging process due to its protective role in neural function (Chen, Xiong, Tong, & Mao, 2013; Criscuolo, Fabiani, Bonadonna, Origlia, & Domenici, 2015; Marosi & Mattson, 2014; Rothman & Mattson, 2013). As mentioned in section 1.7 of the general introduction, the molecule derived from the *BDNF* expression is one of the most abundant brain neurotrophins (Zhang et al., 2007), and its presence is essential for the maintenance, survival, and growth of neurons (Cohen-Cory & Fraser, 1995; Mattson, Maudsley, & Martin, 2004). *BDNF* is also related to the activity-dependent synaptic plasticity, which is crucial for the modulation of several cognitive domains such as learning, memory, and EF (Bath & Lee, 2006; Binder & Scharfman, 2004; Egan et al., 2003; Horch, et al., 1999). However, it is well-known that *BDNF* production decreases with age (Mattson & Magnus, 2006) and more importantly, with the emergence of AD-related neuropathology (Qin et al., 2017). With this background in mind, recent literature (Matyi et al., 2017) has focused on exploring the association between several *BDNF* SNPs and this neurodegenerative disorder, providing additional evidence in support of the interest of further studying this relationship.

³ Rodríguez-Rojo, I. C.,* Cuesta, P.,* López, M. E., de Frutos-Lucas, J., Bruña, R., Pereda, Barabash, A., Montejo, P., Montenegro-Peña, M., Marcos, A., López, R., Fernández, A., & Maestú, F. (2018). *BDNF* Val66Met polymorphism and gamma band disruption in resting state brain functional connectivity: A Magnetoencephalography study in cognitively intact older females. *Frontiers in Neuroscience, Neurodegeneration*. (Published 02 October 2018). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00684>

* These authors contributed equally to this work.

Of particular relevance is the role of the Val66Met *BDNF* SNP, where a Valine (Val) is substituted by a Methionine (Met) at codon 66 (Val66Met, rs6265, G>A) on chromosome 11 (Egan et al., 2003). This functional mutation alters the intracellular trafficking and packaging of proBDNF, affecting the regular activity-dependent expression of the mature BDNF peptide (Chen et al., 2004; Egan et al., 2003). Specifically, Met allele carriers (Val/Met) exhibit a lower BDNF secretion than Val/Val homozygotes (Val/Val) (Kennedy et al., 2014). This alteration has been related to increased hippocampal atrophy (Lim et al., 2013, 2014a; Rabl et al., 2014), loss of white matter integrity (Kennedy & Raz, 2009; Voineskos et al., 2011; Ziegler et al., 2013), greater cognitive decline or higher susceptibility to AD (Huang et al., 2014; Kambeitz et al., 2012; Lim et al., 2014a; Voineskos et al., 2011), and poorer neurocognitive performance in healthy controls (Dincheva, Glatt, & Lee, 2012).

In addition to genetic approach, the detection of abnormal changes in the brain's oscillatory activity is considered nowadays as one of the most suitable strategies in the study of neurodegenerative disorders (Başar & Düzgün, 2016; Pievani et al., 2011). Functional connectivity (FC) estimators are good examples of such new strategies, since they enable the investigation of the brain from the perspective of a complex neural network. As a consequence, brain diseases are contemplated as network disruption processes (Stam, 2014; Varela, Lachaux, Rodriguez, & Martinerie, 2001). Electroencephalography (EEG) and magnetoencephalography (MEG) are non-invasive neuroimaging techniques that directly measure primary neural activity, and provide useful markers to characterize functional synaptic alterations (López et al., 2014; Nakamura et al., 2017; Pievani, Filippini, van den Heuvel, Cappa, & Frisoni, 2014; Stam, 2010). *BDNF* has a regulatory role in the synaptic function, and several studies have reported that the Met allele contributes to the alteration of the morphology and FC in the brain (Beste et al., 2010; Jang et al., 2012; Wei et al., 2012). Therefore, MEG FC emerges as an appropriate tool to assess the effects of *BDNF* in Met carriers and non-carriers.

Considering the aforementioned, we hypothesize that the carriage of a Met allele (i.e. a lower secretion of BDNF) would produce a disruption in the transmission of brain signals that, in turn, alters FC concomitantly to a poorer cognitive performance. To the best of our knowledge, this is the first study assessing the effect of the *BDNF* Val66Met

SNP in MEG functional brain networks. The multimodal analysis undertaken to test this hypothesis also involved structural (i.e. medial temporal lobe volumes), cognitive (i.e. neuropsychological tests), and *APOE* genotyping information from a group of cognitively intact (CI) older females due to their suggested higher predisposition to AD's (Barnes et al., 2005; Fisher et al., 2018; Fleisher et al., 2005; Neu et al., 2017).

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Participants

The original sample consisted of 36 CI elder Caucasian females recruited from the “Hospital Universitario San Carlos”, and the “Center for the Prevention of Cognitive Impairment” of Madrid. All participants underwent an extensive neuropsychological assessment to explore their cognitive functioning, which included the following tests: the Spanish version of the Mini- mental state Examination (MMSE, Lobo et al., 1979, 2002), forward and backward digit span tests (FDS and BDS, Wechsler Memory Scale III, WMS-III; Spanish version; Wechsler, 2004), immediate and delayed recall (IR and DR, WMS-III; Wechsler, 2004), phonemic and semantic fluency (PhF and SF, controlled oral word association test; Benton & Hamsher, 1989), Boston naming test (BNT, Kaplan, Goodglass, & Weintraub, 1983), and trail-making test (TMT) parts A and B (TMT-A and TMT-B, Reitan, 1958). They also underwent a multimodal neuroimaging assessment including Magnetic Resonance Imaging (MRI) and MEG scans. All of them were right-handed, native Spanish speakers and did not differ in age, years of education, MMSE (Folstein et al., 1975; Lobo et al., 1979, 2002) score, or normalized hippocampal volumes (see Table 4.1 for information relative to the characteristics of the participants).

Individuals with any significant medical, neurologic or psychiatric diseases were excluded from the study according to their medical history, neurologic and clinical examination, and MRI results. Inclusion criteria were the absence of significant cerebral-vascular disease (modified Hachinski score ≤ 4) and depressive symptomatology (Yesavage's Depression Scale scores > 9), and an age between 60 and 80 years. In addition, T2-weighted MRIs within 12 months before MEG screening should not show any indication of infection, infarction, or focal lesions (rated by two independent experienced radiologists (Bai et al., 2012)).

Concerning the genetic load, participant's selection was restricted to those homozygous for the *APOE* ϵ 3 allele. Different studies have shown the deleterious effect produced by the combination of being carrier of both the *BDNF* Met allele and the *APOE* ϵ 4 allele (Adamczuk et al., 2013; Hashimoto et al., 2009; Kauppi, Nilsson, Persson, & Nyberg, 2014; Lim et al., 2014b). Based on this, we selected only *APOE* ϵ 3 ϵ 3 individuals, who in turn were classified as carriers and non-carriers of the *BDNF* Met allele (i.e. Val/Met vs. Val/Val), since Met/Met homozygotes were not sufficiently prevalent to conduct specific subgroup analysis.

The Hospital Universitario San Carlos local Ethics Committee approved the study, and all the participants provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and prior to their examination to participate in the clinical studies of cognitive impairment.

Table 4.1: Characteristics of the participants

	Val/Val (n = 20)	Val/Met (n = 16)	Statistics (<i>p</i> value)
Age	70.1 \pm 4.8	70.3 \pm 4.9	0.810
Education (years)	12.6 \pm 4.2	11.3 \pm 5.3	0.453
MMSE	29.3 \pm 1.0	29.5 \pm 0.7	0.505
BNT	54.0 \pm 4.3	51.4 \pm 8.4	0.238
Forward Digit Span	8.7 \pm 2.6	8.0 \pm 1.5	0.345
Backward Digit Span	6.3 \pm 2.1	5.1 \pm 1.7	0.066
Immediate Recall	39.8 \pm 9.9	39.9 \pm 20.1	0.970
Delayed Recall	26.4 \pm 7.3	25.6 \pm 10.0	0.802
Phonemic Fluency	14.6 \pm 3.8	13.9 \pm 4.7	0.656
Semantic Fluency	16.8 \pm 3.8	17.4 \pm 5.0	0.647
TMT-A (time)	48.4 \pm 13.4	58.3 \pm 24.0	0.125
TMT-B (time)	107.6 \pm 46.6	138.1 \pm 77.0	0.144
Left Hippocampal Volume	0.0027 \pm 0.0003	0.0027 \pm 0.0004	0.987
Right Hippocampal Volume	0.0028 \pm 0.0003	0.0027 \pm 0.0004	0.729
Left Entorhinal Volume	0.0016 \pm 0.0002	0.0016 \pm 0.0003	0.854
Right Entorhinal Volume	0.0017 \pm 0.0003	0.0016 \pm 0.0003	0.232

We present values as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using one-way ANCOVA (age as confounding covariate). MMSE = Mini-Mental State Examination, TMT-A = Trail-Making Test part A, TMT-B = Trail-Making Test part B, BNT = Boston Naming Test. Medial temporal lobe volumes were normalized with respect to the overall intracranial volume to account for differences in head volume over subjects.

4.2.2 *BDNF* & *APOE* Genotype Test

DNA was extracted from whole-blood samples of CI older females. As previously described in (Cuesta et al., 2015), *APOE* haplotype was determined by analyzing SNPs rs7412 and rs429358 genotypes with TaqMan assays using an Applied Biosystems 7900 HT Fast Real Time PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA). The same procedure was applied to analyze the *BDNF* rs6265 (Val66Met) SNP. A genotyping call rate over 90% per plate, sample controls for each genotype and negative

sample controls were included in each assay. Three well-differentiated genotyping clusters for each SNP were required to validate results. Intra and inter-plate duplicates of several DNA samples were included.

4.2.3 Structural MRI

We collected 3D T1 weighted anatomical brain MRI scans with a General Electric 1.5T MRI scanner, using a high-resolution antenna and a homogenization PURE filter (Fast Spoiled Gradient Echo (FSPGR) sequence with parameters: TR/TE/TI = 11.2/4.2/450 ms; flip angle 12°; 1 mm slice thickness, a 256x256 matrix and FOV 25 cm). The MRIs were processed with Freesurfer software (version 5.1.0.21) to obtain the volume of gray matter in several brain areas (Fischl et al., 2002), which were normalized with respect to the overall ICV.

4.2.4 MEG

Acquisition

MEG signals were acquired using a whole-head Elekta-Neuromag MEG system with 306 channels (Elekta AB, Stockholm, Sweden), placed in a magnetically shielded room (VacuumSchmelze GmbH, Hanua, Germany), at the Center for Biomedical Technology (Madrid, Spain). Participants sat comfortably on a chair with their eyes closed while 4 minutes of resting state MEG signals data were collected with a sampling frequency of 1000Hz and online band-pass filtered between 0.1 and 330 Hz. The positions of four head-position indicator (HPI) coils attached to the scalp, and each subject's head shape relative to three anatomical locations (nasion and both preauricular points) were defined using a 3D digitizer (Fastrak, Polhemus, VT, USA). The HPI coils continuously controlled the participants' head movements, whereas eye movements were monitored by means of a vertical electrooculograph using a pair of bipolar electrodes. Finally, we supervised the arousal level of each subject through a video camera and checked it via a conversation immediately after the measurement session.

Preprocessing

In order to remove environmental noise, MEG raw data were first submitted to the Maxfilter software with the temporal extension of the signal space separation method (v 2.2, correlation threshold = 0.9, time window = 10 seconds) with movement compensation (Taulu & Simola, 2006). MEG data were automatically scanned for

ocular, muscle, and jump artifacts using the Fieldtrip software (Oostenveld, Fries, Maris, & Schoffelen, 2011). Afterwards, artifacts were visually confirmed by a MEG expert. We segmented the remaining artifact-free data in 4-second segments (trials) and used then in an independent component analysis-based procedure to remove the heart artifact. At least 20 clean 4-second-long trials (80 seconds of brain activity) were then obtained from each participant, and 20 of these clean trials were randomly selected from each subject to equalize the number of trials. Previously to source data calculation, MEG time series were filtered into delta (1-4 Hz), theta (4-8 Hz), alpha (8- 12 Hz), beta (12-30 Hz), and gamma (30-45 Hz) frequency bands with a 1500 order finite impulse response filter designed using Hamming window and a two-pass filtering procedure.

Source Reconstruction

A regular volumetric grid with 10 mm spacing was created in MNI space. This set of nodes was transformed to each participant's space using a non-linear normalization between the native T1 image (whose coordinate system was previously converted to match the MEG coordinate system) and a standard T1 in MNI space. The forward model was solved using the realistic single-shell model introduced by Nolte (2003). Sources reconstruction was performed independently for each subject and frequency band, using a linearly constrained minimum variance (LCMV) beamformer (Van Veen, van Drongelen, Yuchtman, & Suzuki, 1997). In order to combine the two types of sensors in the MEG scan, the leadfields were normalized by sensor type, and the same scaling factor was applied to the data. Beamformer filters were estimated from the average covariance of the trials using a 15% regularization factor. The neural MEG source-space time series were anatomically parcellated by dividing the cortex into 90 regions of interest (ROIs) according to the AAL atlas (Tzourio-Mazoyer et al., 2002). After excluding the cerebellum, basal ganglia, thalamus, amygdala, insula and olfactory cortices, the anatomical model consisted of 72 ROIs. Per each one of them, we selected the first component, obtained with a principal component analysis (PCA), as the representative time series. Finally, the FC was assessed using the phase locking value (PLV), a phase synchronization measure that evaluates the distribution of phase differences extracted from each two ROIs time series (Mormann et al., 2000).

Statistical Analysis

The procedure for statistical comparisons relied on the network based statistics (NBS) introduced by Fornito et al. (2016) and Zalesky et al. (2010), which was carried out independently for each frequency band. The aim of this piece of work was the detection of any robust significant connected subnetworks (assembly of nodes for which a path can be found linking any pair of nodes in that subnetwork). These subnetworks consisted of several significant links (p-value of 0.005, ANCOVA test with age as covariate), which systematically should show either diminished or enhanced FC in the Val/Met group compared with the Val/Val homozygotes. Network-statistics was assessed through the sum of all F-values corresponding with the subnetwork's links. Candidate subnetworks were required to have a minimum size defined by the obligation of involving at least the 10% of the ROIs of the model (i.e. 7 ROIs for our atlas model). Then, to control for the multiple comparisons problem, the entire analysis pipeline was repeated 5000 times after shuffling the original group's labels. At each repetition, the maximum statistic of the surrogate subnetworks was kept creating a maximal null distribution that ensured control of the family-wise error rate (FWER) at the subnetwork level. The network-statistics over each subnetwork in the original data set was compared with the same measure in the randomized data. The NBS p-value represented the proportion of the permutation distribution with network-statistic values greater or equal than the network-statistic value of the original data. Only those subnetworks that survived after the NBS were used for the subsequent analyses as potential "MEG markers". As descriptive values for each significant subnetwork, we computed their average FC (across all links that belong to the subnetwork, i.e. their corresponding strength) values. These data were then used in the exploratory analysis for the correlation (Spearman's correlation) with the neuropsychological scores. In addition, for these strength values, we computed between-group statistical analysis using an ANCOVA with age as covariate. Results were not corrected for the multiple comparisons associated with the assessment of between-group differences in functional brain network for 5 frequency bands. Finally, to rank network's links based on their accuracy to distinguish between both groups, a logistic regression classification analysis with a leave-one-out cross-validation procedure was performed assessing the subnetwork-representative strength and the FC values of the individual links (see López et al., 2014). For classification purposes, Val/Met group was considered deleterious.

Accuracy value represents the fraction of participants correctly classified. Sensitivity and specificity values represent the fractions of Val/Met and Val/Val individuals correctly classified, respectively. Finally, positive predictive values (PPVs) and negative predictive values (NPVs) represent the fraction of individuals classified as Val/Met that were really Val/Val and the fraction of participants classified as Val/Val that were really Val/Met. Statistical analyses were carried out using Matlab R2016a (Mathworks Inc).

4.3 Results

4.3.1 Participant data

Table 4.1 shows the characteristics of the participants. There were no significant ($p > 0.05$) differences in age, educational attainment, neuropsychological performance or hippocampal/entorhinal volumes (Table 4.1).

Results of the FC analysis are summarized in Figures 4.1 and 4.2, and Table 4.2. The network-based FC methodology pointed out the existence of an altered brain network composed by long-range connections between antero-posterior ROIs, showing a significant diminished FC in Val/Met participants when compared to Val/Val homozygotes. This alteration was restricted to the gamma frequency band.

Gamma subnetwork (CBPT p -value = 0.041) comprised nine significant links (Figures 4.1-4.2 & Table 4.2), with a clear antero-posterior pattern in which both (left and right) lateral superior occipital ROIs (l- and rLSOcc) connected with different frontal ROIs. The pattern of connections of the subnetwork (Figure 4.2) showed that both LSOcc ROIs played a role as hubs in two different sub-networks, uniquely connected to each other through the left gyrus rectus ROI. The lLSOcc connected with the right supplementary motor area (rMotor), the right superior frontal gyrus (rSFG), the left gyrus rectus (lRectus), the left orbital superior frontal gyrus (lSFo), and the left anterior cingulate cortex (lACC). On the other hand, the rLSOcc connected with the right orbital inferior frontal gyrus (rIFGo), the right orbital superior frontal gyrus (rSFo) and both gyrus rectus.

Table 4.2. FC results

	FC Val/Val	FC Val/Met	Statistics (<i>p</i> -value)	Classification						
				Accuracy	Sens	Spec	PPV	NPV	Upper B	Lower B
Subnetwork strength	0.149 ± 0.015	0.123 ± 0.010	0.000001	0.861	0.875	0.850	0.824	0.895	0.953	0.705
ILSOcc – rSFG	0.159 ± 0.034	0.129 ± 0.020	0.004026	0.722	0.750	0.700	0.667	0.778	0.858	0.548
ILSOcc – lSFo	0.143 ± 0.020	0.124 ± 0.015	0.003335	0.611	0.625	0.600	0.556	0.667	0.769	0.435
ILSOcc - rMotor	0.178 ± 0.036	0.137 ± 0.040	0.003255	0.694	0.813	0.600	0.619	0.800	0.837	0.519
ILSOcc - lRectus	0.153 ± 0.031	0.124 ± 0.019	0.002542	0.667	0.688	0.650	0.611	0.722	0.814	0.490
ILSOcc – lACC	0.186 ± 0.041	0.145 ± 0.036	0.003522	0.694	0.813	0.600	0.619	0.800	0.837	0.519
rLSOcc – rSFo	0.129 ± 0.021	0.110 ± 0.011	0.001246	0.722	0.813	0.650	0.650	0.813	0.858	0.548
rLSOcc - rIFGo	0.127 ± 0.019	0.111 ± 0.007	0.003521	0.750	0.875	0.650	0.667	0.867	0.879	0.578
rLSOcc - lRectus	0.134 ± 0.022	0.111 ± 0.011	0.000651	0.806	0.875	0.750	0.737	0.882	0.918	0.640
rLSOcc - rRectus	0.131 ± 0.022	0.113 ± 0.012	0.003927	0.667	0.750	0.600	0.600	0.750	0.814	0.490

FC values are presented as mean ± SD. Statistical analyses were performed using one-way ANCOVA (age as confounding covariate). The accuracy, sensitivity and specificity, negative predictive value (NPV) and positive predictive value (PPV) scores were obtained through a logistic regression analysis with leave-one-out cross-validation procedure. The confidence interval (Upper and Lower B) (CI) for the statistic, were calculated using the β approach (**in bold**, the highest scores of each variable). l/r-LSOcc = left/right lateral superior occipital lobe, rMotor = right supplementary motor area, rSFG = right superior frontal gyrus, l/r-Rectus = left/right gyrus rectus, l/r-SFo = left/right orbital superior frontal gyrus, lACC = left anterior cingulate gyrus, rIFGo = right orbital inferior frontal gyrus.

4.3.2 Correlation analysis between MEG FC data and neuropsychological assessment

To further elucidate the relevance of the MEG FC markers to assess cognitive performance, *a set of exploratory* correlation analyses between the MEG FC marker values and cognitive scores were performed (Figure 4.2 & Table 4.3). Figure 4.2 displays a schematic representation of the significant subnetwork, where we have depicted the relationship between links and the results of the correlation analysis, which was carried out including the whole sample and showed a positive correlation between FC values and better cognitive performance (FDS, BDS PhF) and education. Age was negatively associated with the FC between rRectus and rLSOcc ROIs in the Val/Val group. A similar correlation was found in the Val/Met group for the FC between lRectus and rLSOcc, although in this case the p -value was slightly above the threshold ($p < 0.07$).

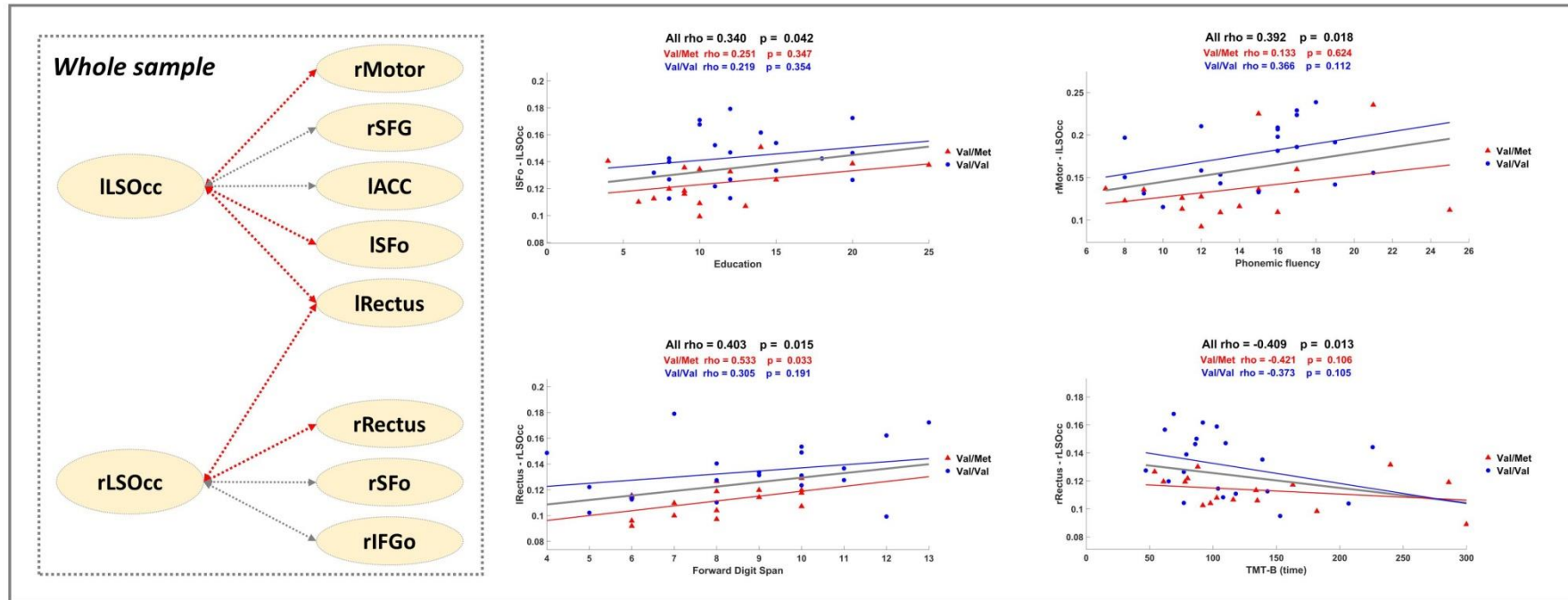


Figure 4.2. Correlation Analysis. The dashed square in the left part presents a summary of the significant results described in Table 4.3. Grey dashed lines correspond to the links of the significant subnetwork. Red dashed lines indicate that the FC of the link is positively correlated with better performance. Scatter plots show some significant Spearman's rho values computed with all individuals within the sample (see bold highlighted values in Table 4.3). Blue and red lines depict, respectively, extra regression analysis carried out uniquely with Val/Val and Val/Met groups (for information purposes).

Table 4.3: FC markers correlation analysis

	lLSOcc – lSFo	lLSOcc - rMotor	lLSOcc - lRectus	rLSOcc - lRectus	rLSOcc - rRectus
Age				(-0.48 *)	[-0.51]
Education	0.34				
Forward digit Span				0.40 (0.53)	
Backward digit Span			0.33	0.33	0.34
Phonemic fluency		0.39	[0.50]		
TMT-B (time)					-0.41

Correlation analysis (Spearman rho values significant at $p < 0.05$) are shown for each FC marker. Rho values are presented on basis of the sample used in the analysis: All sample, (Val/Met sample) or [Val/Val sample]. TMT-B = Trail-Making Test part B, l/r-SOccL = left/right superior occipital lobe, rMotor = right supplementary motor area, rSFG = right superior frontal gyrus, l/r-Rectus = left/right gyrus rectus, l/r-SFo = left/right orbital superior frontal gyrus. Significant correlations are depicted in Figure 3.2. * Result with $0.05 < p < 0.06$. Bold highlighted results are shown in Figure 4.2.

4.3.3 Classification

In order to rank the FC results based on their capability to distinguish between both groups, a classification analysis was performed independently per every individual FC value found in the study, including links and subnetwork strength. The highest accuracy (86.1%) was obtained for the subnetwork strength value, followed by the result of the lRectus – rLSOcc link (80.6%), which supports our approach of focusing on networks rather than individual links. All the classification results are shown in Table 4.2.

4.4 Discussion

In this research, we have carried out a MEG FC analysis to examine the influence of *BDNF* Val66Met SNP in CI older females. We found that Met allele carriers showed a diminished antero-posterior gamma band FC, which might be caused by a reduction in the ability to synchronize corresponding brain areas as accurately as Val/Val participants (Beste et al., 2010). It has been reported that gamma oscillations mainly emerge from the coordinated interaction between excitatory-inhibitory neuronal activity (Buzsáki & Wang, 2012). In fact, GABAergic interneurons (i.e. parvalbumin-

positive interneurons) are the main generators of gamma oscillations (Başar, 2013). In silico models of GABAergic network impairment (e.g. reduced GABAergic innervation or connectivity, or a long decay time of the inhibitory activity), together with studies conducted in AD patients, evidenced a dramatic reduction in the gamma band activity in this population (Başar, 2013; Başar, Durusu, Güntekin, & Yener, 2016; Metzner, Schweikard, & Zurowski, 2016; Stam et al., 2002). On top of that, BDNF has also been found to influence GABAergic interneurons (Holm et al., 2009), and, as a synaptic trophic factor strengthening connections between brain networks, modulates gamma oscillations (Tamura, Shiosaka, & Morikawa, 2017). Therefore, the Met allele carriage apparently weakens this excitatory-inhibitory connection by reducing the amplitude and synchronization of gamma brain waves. Furthermore, the observed FC disruption involves several long-range connections (e.g. the lRectus-rLSOcc with an 80,6% of classification), demonstrating that synchronization in this frequency band has a role not only in local, but also in long-distance networks (Başar, 2013).

Similarly, it should be noted that the alteration of gamma oscillations in resting-state within the AD continuum is still controversial and little explored. Different studies have reported conflicting results showing increased or decreased gamma band activity (Stam, 2010; Stam et al., 2002; Wang, Fang, Wang, Yang, & Yu, 2017). These discrepancies may be due, among other factors, to the severity of the disease and the experimental conditions applied (i.e. task vs. resting-state) (Wang et al., 2017). For example, gamma activity (both spontaneous or evoked/induced), has been located in many cortical brain areas (Fries, 2009) being involved in multiple cognitive functions (Başar, Tülay, & Güntekin, 2015). In addition, Buzsáki and Wang (2012) have stated that the activation of this oscillatory rhythm could vary depending on the underlying mechanism considered. On the other hand, the Met allele mutation in the 5' pro-region of the BDNF protein (possibly leading to an excessive proBDNF production which could be toxic to neurons), produces an imbalance in the correct release of the mature BDNF peptide (Chen et al., 2004; Egan et al., 2003). Besides, BDNF expression is equitably ubiquitous throughout the brain (Zhang et al., 2007), and its receptors are abundantly expressed in parvalbumin-positive interneurons, which are selectively regulated by binding to the mature form of BDNF (Holm et al., 2009). As previously said, these GABAergic interneurons are crucial for the emergence of the gamma band

oscillatory response (Zheng et al., 2011 as cited by Tamura et al., 2017). Thus, it may be that due to this functional mutation, the proBDNF is not only unable to adequately modulate GABAergic activity (Holm et al., 2009), but also to inhibit BDNF's availability, contributing to a potential neurobiological loss of function (Uegaki, Kumanogoh, Mizui, & Hirokawa, 2017). All these evidences support the hypo-synchronized gamma band pattern found in the Met carrier group, highlighting that *BDNF* Val66Met SNP may exert an influence on brain connectivity in healthy and pathological aging.

Regarding the relationship between significant FC results and neuropsychological scores, correlation analyses indicated that enhanced FC in the gamma subnetwork was associated with better cognitive performance (i.e. FDS, BDS and PhF) in the whole sample, but, as can be observed in the regression scatter plots (Figure 4.2), Val/Val homozygotes showed on average more FC. In line with this result, we would like to underscore the positive correlation between the lSFo-lLSOcc FC and education. Education is a well-established proxy of cognitive reserve (CR) (Stern, 2012), and a recent study in CI older adults across a 36-month follow-up period concluded that CR-related differences in executive function decreased in both Val/Val and Val/Met participants, but became more notable in Met carriers (Ward et al., 2017). In our study, both groups showed a similar rho value when the correlation between lSFo-lLSOcc FC and education was performed for each group separately (Figure 4.2). However, the fact that the two groups behaved similarly and given the positive correlations between FC and cognitive performance, it could be suggested that the antero-posterior network activity differences found in our sample could be interpreted as a signature of the underlying mechanisms involved in CR. Following Ward and co-workers (2017) findings, we would expect that the strength of the correlation between FC and the cognitive status will deteriorate to a larger extent for Val/Met participants, constituting a downstream marker of aging-related neurodegeneration. Finally, the negative association between the rRectus-rLSOcc FC and age within the Val/Val group (not achieving statistical significance for the Val/Mets) supports the evidence that BDNF levels decrease throughout the aging process (Mattson & Magnus, 2006; Sohrabji & Lewis, 2006) and, therefore, another possible mechanism of greater susceptibility to age-related cognitive impairment.

From our point of view, these results suggest that electrophysiological resting-state FC, as measured by MEG, could be potentially considered as a non-invasive, sensitive biomarker enabling the assessment of brain functional integrity associated with genetic factors (Chiesa, Cavedo, Lista, Thompson, & Hampel, 2017; Papenberg, Salami, Persson, Lindenberger, & Bäckman, 2015; Schofield et al., 2009; Voineskos et al., 2011), such as the *BDNF* Val66Met SNP. FC studies like the present one are expected to deepen the understanding of the pathophysiological processes underlying healthy and pathological aging (Babiloni et al., 2016; Walsh et al., 2017).

4.4.1 Limitations and future directions

The evidence presented here emphasizes the relevance of the neuroimaging genetics field. However, there are several methodological issues that should be considered and that, as in many other cases could account for the conflicting results found through the literature on *BDNF* Val66Met SNP (for more information see Notaras & Hill, 2015). For example, the effect of the Met/Met genotype could not be appropriately examined (Forde et al., 2014; Zdanys et al., 2009). This is an important issue because the reduced dependent release of BDNF could vary from 18% for one Met allele to 29% in the Met/Met homozygous cases (Chen et al., 2006). In addition, analyzing additive or gene-gene interactions (Kauppi et al., 2014; Kennedy et al., 2014), ethnicity (Brooks et al., 2014; Lin, Cheng, Xie, & Zhang, 2014), other *BDNF*'s SNPs (e.g. rs56164415 or rs2072446) (Matyi et al., 2017), their epigenetic modulation, and gender differences, could also contribute to clarify *BDNF*'s role in human brain functioning and neurodegeneration (Boulle et al., 2012; Honea et al., 2013).

Besides, we only selected CI older females who were *APOE* $\epsilon 3\epsilon 3$, not including *APOE* $\epsilon 4$ allele carriers, neither its interaction with *BDNF* Val66Met SNP. Anyway, a study conducted by Sen and co-workers found that *APOE* $\epsilon 3$ had little or no effect on *BDNF* levels (Sen et al., 2015 as cited by Fisher et al., 2018). This supports, on the other hand, the suitability of the selected study sample, since our results could be more purely restricted to the *BDNF* Val66Met SNP effects. In addition, while several studies have reached the conclusion that age-related pathological changes in brain structure and function could occur independently of genetic influence (Erickson, Miller, & Roecklein,

2012), others claim that the genetic harmful effects may emerge as a factor of age (i.e. the antagonistic pleiotropy theory of aging; Li et al., 2010; Voineskos et al., 2011; Williams, 1957). Therefore, the implementation of longitudinal studies could be an interesting way to shed light on how different genetic variations could affect different brain disorders throughout the entire life cycle (Gruber et al., 2012; Papenberg et al., 2015).

Finally, three more concerns should be highlighted. The first one is related to the non-existence of hippocampal volume differences between groups as reported in Lim et al. (2013, 2014a) and Rabl et al. (2014). We would like to clarify that Lim and collaborators (2013) were the only ones focused on a CI older adult population. However, that study was longitudinal, with a higher sample size than ours ($N = 165$), without contemplating sex differences and where $A\beta$ levels were also taken into account. Thus, we believe that none of the cited references challenge our results. Secondly, and regarding the analytical procedure, another possible limitation, particularly affecting low frequency bands results, would be the selection of 4 seconds length epochs. Longer epochs would increase the frequency-associated reliability, but we decided to keep 4 seconds, based on previous studies of our group and the good trade-off between number of clean epochs and frequency resolution (Dimitriadis et al., 2018; Nakamura et al., 2017). Thirdly, we are aware that the FC metric (PLV) could be theoretically affected by source leakage. However, we believe that this is not the case for our results since: a) the analysis conducted consisted on a between-groups comparison. This approach reduces the possibility of having false results driven by source leakage as this problem would be affecting both groups equally and b) the subnetwork described in this paper was composed by long distance links, which are less likely to be affected by this issue.

5. ESTUDIO EXPERIMENTAL III

Puntuación de riesgo genético y EA: Un estudio de MEG y CF en una muestra de mujeres ancianas sanas.

5.1 Introducción

Durante los últimos diez años, la mayoría de las investigaciones se han centrado en el estudio del efecto individual de determinados factores de riesgo genético de la EA sobre la estructura y la función cerebral (Dima & Breen, 2015). Como se mencionó en el apartado 1.6 de la introducción general, gracias a los GWAS (Lambert et al., 2013), la identificación de dichos factores de riesgo genético o SNPs ha propiciado el descubrimiento de nuevas perspectivas con respecto a posibles mecanismos biológicos implicados en la susceptibilidad a la EAOE como el metabolismo lipídico, la respuesta inmune o la endocitosis (Guerreiro et al., 2013a; Jones et al., 2010; Karch & Goate, 2015; Morgan, 2011; Pimenova et al., 2018). Es decir, rutas moleculares cuya alteración podría influir sobre la progresión de dicha enfermedad y que, en parte, suponen una explicación alternativa al entendimiento de la misma desde las hipótesis más clásicas relacionadas con la cascada amiloide o la deposición de proteína tau (Louwersheimer et al., 2016).

Sin embargo, la evidencia más reciente ha demostrado que el efecto de un SNP de forma aislada no consigue capturar adecuadamente la arquitectura genética que podría estar contribuyendo al desarrollo de la EAOE, ya que, cada uno de ellos, posee un efecto individual muy sutil que podría llegar a ser poco informativo (Purcell et al., 2009; Rodríguez-Rodríguez et al., 2013). Es por ello que el cálculo de una PRG que englobe el mayor número posible de SNPs ha comenzado a cobrar protagonismo al mejorar el valor predictivo del riesgo de padecer esta enfermedad neurodegenerativa (Dima & Breen, 2015; Dudbridge, 2013; Escott-Price et al., 2015, 2017; Harrison et al., 2016; Jones et al., 2010; Lambert et al., 2013; Lupton et al., 2016; Tosto et al., 2017). Por poner solo un ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Ridge et al., (2013) se observó que la consideración de una PRG de más de 2 millones de SNPs pertenecientes a la base de datos del consorcio sobre genética de la EA (Alzheimer's Disease Genetic Consortium, ADGC por sus siglas en inglés; Naj et al., 2011), explica el 33% de la varianza fenotípica de la enfermedad, en comparación al 6% de la varianza explicada

por el gen *APOE* de forma aislada, o el 8% derivada de la combinación de otros 11 SNPs descritos en GWAS previos.

Por su parte, los estudios de neuroimagen en estado de reposo (resting-state) no solo han contribuido a revelar cómo algunos de estos factores de riesgo genético pueden afectar a la CF cerebral (Chiesa et al., 2017; Walsh et al., 2017). También ofrecen una mejor comprensión de las vías y/o mecanismos implicados en la interacción dinámica entre los genes, el cerebro y el ambiente, para intentar dar forma a la variabilidad comportamental entre individuos y, sobre todo, para definir más fielmente el riesgo o susceptibilidad ante el padecimiento de una determinada enfermedad (Munoz, Hype, & Hariri, 2010). Esto cobra especial sentido entre personas ancianas sanas con factores de riesgo genético de la EA, donde el desarrollo de biomarcadores preclínicos es fundamental tanto para la detección precoz como para la prevención de la misma (Chiesa et al., 2017; Thomas et al., 2014; Walsh et al., 2017). Mientras que el gen *APOE* es uno de los factores de riesgo más determinantes en la EAOE, se han identificado al menos otras 20 variantes genéticas adicionales que también están relacionadas con la enfermedad (Lambert et al., 2013). De entre ellas, algunas de las variantes de riesgo de los genes *CLU*, *PICALM* y *CRI* han sido de las más estudiadas desde una aproximación neurogenética (Biffi et al., 2010; Bralten et al., 2011; Braskie et al., 2011a; Erk et al., 2011; Furney et al., 2011; Hohman, Koran, & Thornton-Wells, 2013; Green et al., 2014; Stevens, DiBattista, William-Rebeck, & Green, 2014; Zhang et al., 2015; Harrison & Bookheimer, 2016).

Teniendo en cuenta esto, se ha procedido a calcular una PRG considerando el posible efecto combinado del SNP rs11136000 del gen *CLU*, el SNP rs3851179 del gen *PICALM* y el SNP rs6656401 del gen *CRI*. Asimismo, partiendo de la base de que la disminución progresiva de la plasticidad sináptica y la CF entre neuronas y/o regiones cerebrales podría considerarse el sello neurofisiológico del envejecimiento cerebral (Cook & Leuchter, 1996; Chiesa et al., 2017; Sala-Llonch et al., 2015; Thomas et al., 2014; Walsh et al., 2017) y, donde la MEG se erige como una excelente candidata para evaluar dichas alteraciones funcionales (López et al., 2014; Nakamura et al., 2017; Pievani et al., 2014; Stam, 2010), el principal objetivo del presente estudio se desglosa en dos: 1) explorar si una mayor PRG de EA produce una mayor disminución de la CF en resting-state en un grupo de mujeres ancianas sanas por su mayor predisposición a

desarrollar EA (Barnes et al., 2005; Fisher et al., 2018; Fleisher et al., 2005; Neu et al., 2017) y b) en caso afirmativo, comprobar si la CF de las regiones cerebrales afectadas por el efecto acumulado de los SNPs estudiados en nuestra muestra coinciden con algunas de las regiones representadas en la figura 5.1, donde se puede observar sobre qué áreas cerebrales ejerce principalmente su efecto cada una de las variantes genéticas de riesgo de los genes mencionados de manera individual.

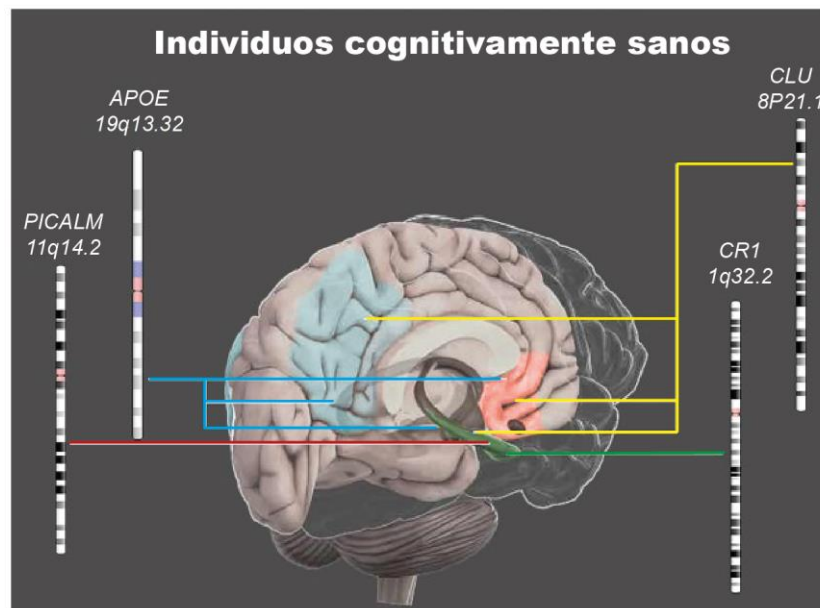


Figura 5.1. Principales efectos de algunos factores de riesgo genético de EA sobre la CF de individuos cognitivamente sanos. Mutaciones genéticas en los genes *APOE* y *CLU* parecen afectar la CF de a) la red neuronal por defecto anterior (cingulado anterior y regiones prefrontales mediales) en rojo, b) la red neuronal por defecto posterior (cingulado posterior, precúneo, lóbulo parietal inferior en color azul y c) el hipocampo (en verde). Por el contrario, mutaciones genéticas en los genes *PICALM* y *CR1* parecen afectar esencialmente la conectividad del hipocampo (Adaptado de Chiesa et al., 2017).

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Participantes

La muestra de participantes está compuesta por 81 mujeres ancianas cognitivamente intactas procedentes del Hospital Clínico San Carlos, del Centro de Prevención del Deterioro Cognitivo y del Centro de Mayores del Distrito Chamartín de Madrid. A todas ellas se les realizó una evaluación neuropsicológica para valorar su funcionamiento cognitivo mediante la administración de los siguientes tests: el Mini

Examen del Estado Mental (Mini-Mental State Examination en inglés, MMSE) (Lobo et al., 1979, 2002), las pruebas de dígitos directos e inversos y recuerdo inmediato y demorado de la Escala de Memoria de Wechsler III (WMS-III; versión española, Wechsler, 2004), las pruebas de fluidez fonémica y semántica (Benton & Hamsher, 1989), el test de denominación de Boston (Boston naming test en inglés, BNT) (Kaplan et al., 1983), y el Trail Making Test partes A y B (TMT-A and TMT-B; Reitan, 1958). Además de las pruebas cognitivas, se les hizo una Resonancia Magnética (RM) y una MEG. Todas las participantes del estudio eran diestras, hispanohablantes, y no presentaron diferencias en edad, años de educación, puntuaciones en el MMSE o volumen normalizado de hipocampo (ver la tabla 5.1 para obtener información relativa a las características de las participantes).

Tabla 5.1. Características de las participantes.

	<i>APOE</i> ε4+ (n = 15)	<i>APOE</i> ε4- (n = 66)	<i>p</i> -valor
Edad	70.5 ± 5.2	70.2 ± 4.6	0.828
Educación (Años)	14.2 ± 5.1	12.6 ± 4.8	0.276
PRG	0.91 ± 0.41	1.02 ± 0.33	0.250
MMSE	28.7 ± 1.2	29.2 ± 1.0	0.066
BNT Espontáneas	51.8 ± 4.3	52.6 ± 6.8	0.474
BNT Fonológica	5.0 ± 2.5	3.8 ± 3.5	0.181
Dígitos Directos	8.1 ± 2.4	8.3 ± 2.1	0.693
Dígitos Inversos	5.5 ± 1.6	5.6 ± 1.9	0.639
Recuerdo Inmediato	40.7 ± 9.6	38.8 ± 9.5	0.666
Recuerdo Demorado	23.6 ± 7.3	24.3 ± 8.1	0.626
Fluidez Verbal Fonológica	14.3 ± 6.0	13.8 ± 3.5	0.763
Fluidez Verbal Semántica	17.0 ± 3.0	16.5 ± 3.4	0.732
TMT-A (tiempo)	46.3 ± 12.2	53.4 ± 17.6	0.184
TMT-B (tiempo)	104.2 ± 44.8	124.9 ± 64.7	0.260
VHI	0.0026 ± 0.0003	0.0026 ± 0.0003	0.591
VHD	0.0026 ± 0.0003	0.0027 ± 0.0003	0.147
VEI	0.0015 ± 0.0004	0.0016 ± 0.0002	0.566
VED	0.0016 ± 0.0003	0.0016 ± 0.0002	0.348
VPHI	0.0015 ± 0.0003	0.0015 ± 0.0003	0.701
VPHD	0.0014 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0002	0.478

En la siguiente tabla se presentan las medias y desviaciones típicas de las variables enumeradas para cada uno de los grupos en los que se ha estratificado la muestra (*APOE* ε4+ y *APOE* ε4-). El análisis estadístico consistió en un ANCOVA con la edad y la educación como covariables. MMSE = Mini-Mental State Examination (Mini Examen del Estado Mental), TMT-A = Trail-Making Test parte A, TMT-B = Trail-Making Test part B, BNT = Boston Naming Test (Test de Denominación Boston). VHI = Volumen Hipocampo Izquierdo, VHD = Volumen Hipocampo Derecho, VEI = Volumen Córtex Entorrinal Izquierdo, VED = Volumen Córtex Entorrinal Derecho, VPHI = Volumen Parahipocampo Izquierdo, VPHD = Volumen Parahipocampo Derecho. Todos los volúmenes de las regiones mediales temporales mencionadas fueron normalizados con respecto al volumen intracraneal total.

Aquellas participantes con alguna afección médica, neurológica y/o psiquiátrica fueron excluidas del estudio teniendo en cuenta para ello su historial médico, los resultados derivados del examen clínico y/o neurológico así como las pruebas de RM. Como criterios de inclusión se tuvieron en cuenta la ausencia de patología cerebrovascular (puntuación en la Escala de Hachinski ≤ 4) o sintomatología depresiva (puntuación en la Escala de Depresión de Yesavage > 9), y una edad comprendida entre los 60 y los 80 años. Además de esto, la secuencia potenciada en T2 de la RM no debía presentar ningún signo de infección, infarto o lesiones focales dentro de los 12 meses previos a la realización de la MEG. Esta evaluación se llevo a cabo por dos radiólogos expertos de manera independiente (Bai et al., 2012).

El comité de ética del Hospital Clínico San Carlos aprobó el estudio y todas las participantes firmaron un consentimiento informado de acuerdo a los principios éticos promulgados por la Declaración de Helsinki, momento en el que también tuvieron la oportunidad de hacer preguntas y resolver dudas relativas a la investigación antes de confirmar su participación en el estudio.

5.2.2 Genotipado

La metodología a seguir ha sido la misma que la descrita en los estudios 3 y 4. Sin embargo, teniendo en cuenta que en dicho capítulo es donde se ha genotipado un mayor número de SNPs, se ha considerado proceder a la realización de una descripción más pormenorizada de los análisis genéticos llevados a cabo:

Para la extracción de ADN se obtuvieron 10 ml de sangre periférica de cada una de las participantes en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La sangre fue procesada en el momento de su extracción o fue almacenada a -20°C hasta el momento de su procesamiento. El ADN se extrajo de leucocitos periféricos mediante técnicas estándar consistentes en una serie de lavados con tampón de lisis de hematíes (109,4 gr de sacarosa; 10 ml de Tris 1M pH 7.5; 5ml MgCl_2 1M; 10ml Tritón x-100; agua destilada hasta alcanzar 1 litro). Tras los lavados se realizó una purificación de ADN mediante el kit de extracción con DNAzol® - Genomic DNA Isolation Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) (Chomczynski, Mackey, Drews, & Wilfinger, 1997), siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez obtenido el ADN se traspasó a un criotubo que contenía una solución de TRIS-EDTA (Tris 2M a pH 8, 50

μl; EDTA 0,5 M a pH 8, 20 μl, añadiendo agua destilada hasta 100 ml). Su concentración y su pureza se obtuvieron mediante espectrofotómetro Nanodrop® 2000/2000C (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Todas las muestras alcanzaron una pureza de 1,6 y 1,8. Las soluciones madre se guardaron en un congelador a -40°C.

El análisis de los SNPs de los genes estudiados se realizó por discriminación alélica Taqman. Para ello se realiza una amplificación de la región de interés mediante el uso de dos “primers” o cebadores. Por otra parte, se diseña un oligonucleótido que contiene dos fluorocromos, uno en el extremo 5’ (reporter) y otro en el 3’ (quencher). Estas sondas TaqMan están diseñadas para hibridarse a una región interna del producto de PCR (polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés; contienen las bases complementarias de las variantes del polimorfismo de interés). Conforme la Taq polimerasa efectúa la extensión, la actividad 5’ exonucleasa de la enzima libera el fluorocromo reporter generando una señal fluorescente, que será proporcional a la cantidad de producto de PCR sintetizado. En función de los alelos de la muestra se observará un tipo u otro de fluorescencia, VIC® o FAM™. La fluorescencia de la sonda marcada con VIC® indica homocigosidad del alelo 1, la de la sonda marcada con FAM™ indica homocigosidad del alelo 2 y la de ambas indica heterocigosidad de los alelos 1 y 2. La Figura 5.2 muestra uno de los ensayos de discriminación alélica como ejemplo. Para la detección de esta fluorescencia se ha empleado el aparato 7500 Fast Real-Time PCR de Applied Biosystems, Life Technologies Corporation®. En todas las placas de 96 pocillos se han incorporado controles internos para comprobar que el genotipado ha sido correcto y no ha habido contaminación. Todos los reactivos necesarios se han obtenido de la casa comercial Applied Biosystems. Para los primers y las sondas de los SNPs se han utilizado ensayos disponibles comercialmente prediseñados (TaqMan SNP Genotyping Assays, Life Technologies Corporation®).

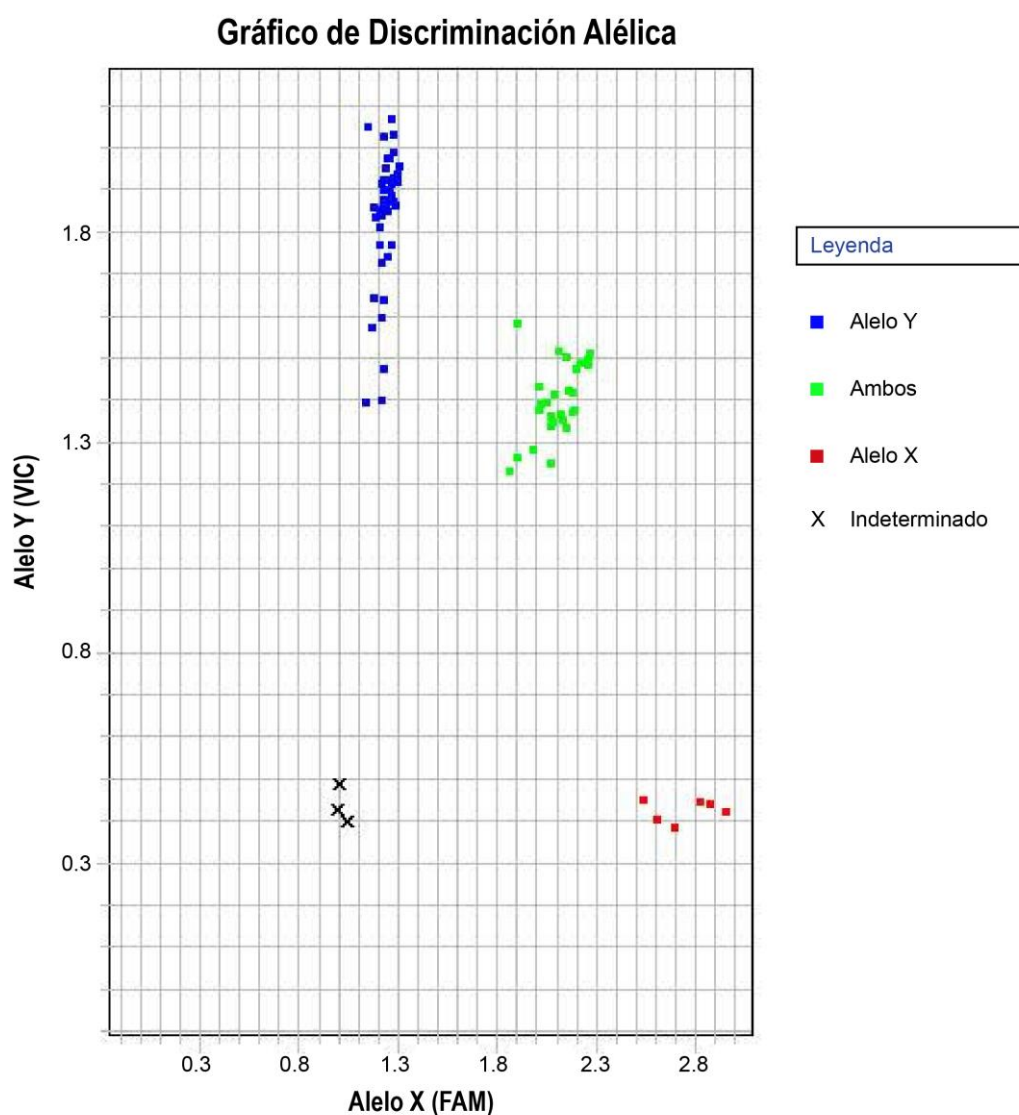


Figura 5.2. Ejemplo de discriminación alélica de cualquiera de los SNPs de la tabla 5.2.

5.2.3 Cálculo de la PRG

La PRG de cada uno de los participantes ha sido extraída de los resultados hallados en el GWAS llevado a cabo por el IGAP (Lambert et al., 2013; http://web.pasteur-lille.fr/en/recherche/u744/igap/igap_download.php) y del artículo de Lacour y colaboradores (2017). La fórmula utilizada al respecto es la siguiente:

$$z_{pgs} = \frac{\sum_{ie\{snps\}} z_i \ln OR_i}{\sum_{ie\{snps\}} \ln OR_i},$$

Donde, en primer lugar, se asignan diferentes puntuaciones a cada uno de los alelos de cada SNP: 0 para los homocigotos portadores del alelo protector, 1 para los heterocigotos (tendrían un alelo de riesgo y otro protector) y 2 para los homocigotos portadores de dos alelos de riesgo. A su vez, esta puntuación se multiplica teniendo en cuenta el logaritmo de las OR de los riesgos observados por el IGAP para cada alelo de riesgo de cada uno de los SNPs (tabla 5.2). De este modo, aquellos individuos con 2 alelos de riesgo tendrían una PRG más alta para un SNP en concreto que los que tienen solo 1 o ninguno (en este último caso se obtendría una puntuación igual a 0). A continuación, se lleva a cabo el sumatorio de los resultados obtenidos para cada uno de los SNPs y se divide entre el sumatorio de los logaritmos de las OR de todos los SNPs considerados en la PRG. Al dividir los resultados entre la suma de los logaritmos de todas las OR de los SNPs usados, obtenemos PRG comparables que oscilan en un continuo de valores que van de 0 a 2, donde 0 supone tener un riesgo mínimo de asociación con la enfermedad y 2 correspondería a la máxima PRG. Por otro lado, el gen *APOE* no se ha incluido en el cálculo de la PRG dado el importante grado de asociación del alelo $\epsilon 4$ de este gen con la susceptibilidad a desarrollar EA (Corder et al., 1993; Chauhan et al., 2015; Mahley, 2016). En su defecto, y a pesar de que el objetivo del estudio es observar si a mayor PRG se da una mayor disminución de la CF en toda la población sometida a estudio, se ha estratificado la muestra entre portadoras (n=15) y no portadoras del alelo $\epsilon 4$ (n=66) con el fin de “poder aislar” cualquier posible resultado atribuible al efecto perjudicial de poseer este alelo de riesgo y así poder examinar de forma independiente la influencia de la PRG de interés.

Tabla 5.2. OR y frecuencias alélicas de cada uno de los alelos de riesgo de los SNPs estudiados.

SNP	Cromosoma	Gen	Alelos			Odds Ratio	Frecuencia alélica (alelo de riesgo)
			menor	mayor	riesgo		
rs11136000	8	<i>CLU</i>	T	C	C	1.16	0.6548
rs3851179	11	<i>PICALM</i>	A	G	G	1.15	0.7136
rs6656401	1	<i>CRI</i>	A	G	A	1.18	0.1659

5.2.4 RM Estructural

Se obtuvieron imágenes de RM 3D potenciadas en T1 con un escáner de 1,5 Tesla de la marca General Electric. Para ello se usó una antena de alta resolución y un filtro de homogeneización PURE (Secuencia Fast Spoiled Gradient Echo, (FSPGR) con parámetros TR, TE y TI de 11,2, 4,2 y 450 ms respectivamente; ángulo de excitación 12°; campo de visión de 256x256 vóxeles (25 cm); y grosor de rodaja de 1 mm). Para las segmentaciones se utilizó el software Freesurfer (version 5.1.0.21) con el fin de obtener los volúmenes cerebrales de sustancia gris de diferentes regiones de interés (Fischl et al., 2002), que a su vez fueron normalizados con respecto al volumen intracraneal total.

5.2.5 MEG

Registros

Los registros de actividad biomagnética cerebral de los participantes se realizaron en estado de reposo mediante un sistema Elekta Neuromag Vectorview que consta de 306 sensores; 102 magnetómetros y 204 gradiómetros planares divididos en dos grupos de 102 para cada dirección tangencial a la superficie del cráneo. El sistema MEG está instalado dentro en una sala aislada (VacuumSchmelze GmbH, Hanua, Alemania), situada en el Laboratorio de Neurociencia Cognitiva y Computacional, compartido por las universidades Complutense y Politécnica de Madrid, dentro del Centro de Tecnología Biomédica de la Universidad Politécnica de Madrid. Durante el registro, los participantes estuvieron sentados en posición relajada, con los ojos cerrados y lo más inmóviles posible durante 4 minutos. La actividad electrofisiológica cerebral fue registrada, aplicando un filtro online pasa banda entre 0,1 y 330 Hz, con una frecuencia de muestreo de 1000 Hz. Para evitar que los participantes entraran en un estado de somnolencia durante el registro, se hizo uso de una videocámara localizada en el interior del sistema MEG que permitiera monitorizar y chequear de forma constante (mediante una serie de preguntas control) el nivel de arousal de los mismos. Los movimientos de la cabeza durante los registros fueron monitorizados mediante 4 sensores (bobinas HPI) en cuatro posiciones específicas de la cabeza de los individuos: 2 situados en la parte frontal, uno a cada lado y 2 situados en la parte temporal, justo detrás de cada oreja a la altura del hueso mastoideo. Además, se fijaron otros tres sensores, comúnmente denominados en neuroimagen “*fiducials*”, encargados de marcar

3 posiciones anatómicas estándares; el punto “*nasion*”, situado justo entre el comienzo de la nariz y el punto medio entre ambos ojos y los preauriculares situados justo en el inicio de cada oreja a la altura del orificio auditivo. La localización de estos sensores fue digitalizada mediante un sistema Fastrak Polhemus. Mediante dicho sistema, se digitalizó un modelo tridimensional del cráneo de los participantes necesario para el posterior acople o realineado entre los datos MEG y el modelo anatómico obtenido mediante la imagen con RM. Por último, un set de electrodos bipolares colocados en las partes inferior y superior del ojo derecho y en el lóbulo de la oreja derecha fueron utilizados para monitorizar la ocurrencia de parpadeos y como toma de tierra respectivamente.

Preprocesado

Con el objetivo de reducir el ruido ambiental, los registros MEG fueron filtrados mediante el software propio de Elekta “Maxfilter” v2.2 (umbral de correlación = 0.9, ventana temporal = 10 segundos) que consiste en la descomposición de las señales MEG en un conjunto de armónicos esféricos con dos posibles orígenes: el interior del casco MEG o el exterior de éste (Taulu and Simola, 2006). Este software, tras determinar qué fuentes se hallaban localizadas en el interior de la cabeza gracias al modelo tridimensional digitalizado anteriormente, reconstruyó las señales MEG únicamente teniendo en cuenta a dichas fuentes y proyectando las señales MEG sobre un eje de coordenadas fijo para toda la duración del registro, de forma que, los posibles movimientos de la cabeza durante el mismo, quedarán corregidos. A continuación, los datos MEG fueron segmentados en épocas (también llamados trials) con una duración de 4 segundos. La elección de dicha duración fue llevada a cabo en base al balance entre la maximización de la duración de las señales y la minimización de la pérdida de épocas debido a la posible presencia de artefactos. Tras la segmentación, se aplicó una serie de análisis automáticos mediante el toolbox Fieltrip (Oostenveld et al., 2011) con el objetivo de determinar la presencia de tres tipos de artefactos en los datos MEG: saltos “*jumps*”, musculares y parpadeos. La presencia de dichos artefactos fue confirmada visualmente, descartándose aquellas épocas en las que éstos estuvieran presentes. En el presente estudio únicamente aquellos participantes con al menos 20 épocas limpias (80 segundos de actividad cerebral) fueron incluidos. De este modo, para todos los participantes se seleccionaron únicamente 20 épocas, donde se eligieron aleatoriamente

20 de ellas en aquellos casos en los que tuvieran un mayor número. Las señales MEG fueron filtradas en bandas de frecuencia mediante un filtro “*Finite Response Filter*” (FIR) de orden 1500 diseñado con una ventana Hamming. El filtro fue aplicado haciendo dos pasadas, una hacia adelante y otra hacia atrás, con el fin de evitar distorsiones en la fase. Las bandas fueron definidas en concordancia con las bandas clásicas: delta (1-4 Hz), theta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz), beta (12-30 Hz) y gamma (30-45 Hz).

Modelo de fuentes generadoras y cálculo de la CF entre las mismas

El análisis en el espacio de fuentes generadoras se ha convertido en la actualidad en el estándar de la investigación en neurociencia. Más específicamente, la localización de fuentes tiene como objetivo describir la extensión, orientación y evolución temporal de las fuentes que generan la actividad medida, resolviendo así el llamado problema inverso a partir del registro de la actividad eléctrica o magnética cerebral (Baillet, Mosher, & Leahy, 2001; Darvas, Pantanzis, Kukucaltun-Yildirim, & Leahy, 2004). Para trabajar en el espacio de fuentes es recomendable disponer de la RM del individuo ya que si no, habría que usar un template y, éstos, en general, no dan tan buenos resultados como las resonancias originales.

De este modo, el espacio de fuentes generadoras fue modelado mediante un grid regular con 1 cm de espaciado entre nodos creado en el template de RM del Instituto Neurológico de Montreal (en inglés Montreal Neurological Institute, MNI). Este modelo volumétrico contiene 2459 nodos, que determinan las posiciones de los dipolos de corriente que conforman el modelo, rellenando todo el volumen cerebral. A continuación, se normalizaron las resonancias de cada participante, previamente alineadas con sus respectivas MEG, con la resonancia del template MNI. El grid en espacio template fue adaptado a cada participante mediante la aplicación de la inversa de la matriz de transformación obtenida en dicha normalización. De esta forma cada nodo en el espacio sujeto/participante tenía su correspondencia en el espacio template. Una vez obtenido el modelo de la cabeza se llevó a cabo la resolución del modelo directo (cómo deducir los campos medidos en sensores si se conocen las corrientes cerebrales) o “*leafield*” mediante el método desarrollado por Nolte (Nolte, 2003). Este método, implementado en Fieltrip, emplea un modelo esférico corregido “*single Shell*”

y es el más utilizado en la resolución del problema inverso con sistemas MEG Elekta. Con el propósito de poder combinar las señales de ambos tipos de sensores (magnetómetros y gradiómetros), el leadfield de cada sujeto fue normalizado para cada tipo de sensor. Además, el mismo factor de escalado fue aplicado a las correspondientes señales MEG. El modelo inverso fue resuelto mediante el método de beamformer denominado linearly constrained minimum variance (LCMV) (Van Veen et al., 1997). Beamformer es un filtro espacial adaptativo que estima la actividad en cada dipolo de manera independiente. El método funciona de una manera similar a los filtrados temporales paso-banda, en los cuales se selecciona el contenido frecuencial de una señal solo que, en este caso, el filtrado espacial selecciona las señales que provengan de un determinado volumen cerebral. Específicamente, para cada banda de frecuencia, se obtuvo un único filtro espacial del beamformer a partir de la matriz de covarianza calculada con todas las épocas con un factor de regularización del 15% y, posteriormente, dicho filtro fue aplicado en cada época para reconstruir las señales temporales de los 2459 nodos del grid. El último paso consistió en el cálculo de la CF entre cada par de nodos del grid mediante el método PLV, índice que como ya se dijo en el apartado 4.2.4 del capítulo anterior, evalúa la distribución de los valores de las diferencias entre las fases de las señales de cada par de nodos (Mormann et al., 2000). De esta forma se obtuvieron matrices para cada participante con dimensiones: $2459 \times 2459 \times 5$ bandas de frecuencia. Para el presente estudio, se utilizó un modelo anatómico basado en el atlas Automated Anatomical Labeling (AAL) (Tzourio-Mazoyer et al., 2002), de forma que únicamente aquellos nodos localizados dentro de algunas de las regiones corticales o de las regiones mediales temporales de dicho atlas fueron empleados en los análisis subsiguientes. En particular, al aplicar el atlas al grid éste se redujo a únicamente 1202 nodos de forma que las matrices de CF pasaron a tener dimensiones: $1202 \times 1202 \times 5$ bandas de frecuencia. Con el objetivo de tener un único valor representativo para cada nodo del grid, estas matrices fueron promediadas creando para cada banda de frecuencia un vector de 1202 valores correspondientes a la CF media de cada nodo con toda la red. Este parámetro es empleado comúnmente en teoría de grafos y es denominado strength (Stam, 2014). De esta forma, para cada sujeto, los datos de partida consistieron en matrices de 1202 valores de strength \times 5 bandas de frecuencia \times 81 participantes.

Análisis de correlación

Para el presente estudio se desarrolló una metodología basada en el toolbox network-based statistics (NBS) creado por Zalesky y colaboradores (Fornito et al., 2016; Zalesky et al., 2010) y aplicada para cada banda de frecuencia de manera independiente. La motivación para el desarrollo de este tipo de análisis fue determinar la existencia de volúmenes cerebrales cuya dinámica global tuviera un comportamiento similar en cuanto a su posible relación con el valor de la PRG calculada. El proceso consistió en los siguientes pasos:

1. Cada participante estaba representado por un vector de 1202 valores de strength relativos a los 1202 nodos del grid.
2. Para cada valor de strength se calculó su correlación parcial (Spearman), usando la edad y la educación como covariables con el valor de PRG en toda la población de forma que se obtuvieron dos vectores: uno compuesto por 1202 valores de coeficientes de correlación y otro conformado por los correspondientes 1202 *p-valores*. Los coeficientes de correlación con valores *p* no significativos ($p\text{-valor} < 0.001$) fueron fijados a 0.
3. El vector de 1202 coeficientes de correlación obtenido en el paso anterior fue segregado en 2 vectores binarios de 1202 elementos correspondientes a las correlaciones significativas de cada signo. De esta manera, el vector relativo a las correlaciones significativas de signo positivo/negativo ostentaba un valor 1 para aquellos valores cuyos coeficientes de correlación fueran positivos/negativos, respectivamente. Así pues, se obtuvo una representación de las regiones cerebrales cuya CF media correlacionaba con un determinado signo con el valor de PRG. El uso de un umbral tan restrictivo como 0,001 fue elegido con el objetivo de determinar con una mayor resolución espacial las regiones cerebrales cuya CF media tuviera una clara relación con el índice de PRG.
4. Como cada posición de dichos vectores refería a una determinada posición espacial en el modelo cerebral, se aplicó un “*clustering*” espacial para agrupar aquellas regiones colindantes cuyo comportamiento fuera semejante (y significativo). Si una determinada región alcanzaba un volumen mínimo, determinado por contener al menos el 10% de los nodos del grid, era

considerado como una posible solución significativa denominada clúster. Para cada clúster se obtuvo un valor representativo consistente en la suma de todos los coeficientes de correlación (en valor absoluto) de los nodos incluidos en el mismo (estadístico del clúster).

5. Con el objetivo de controlar el “*family-wise error rate*” (FWER) se aplicó un método de permutaciones no paramétrico que consiste en la repetición (5000 veces) de los pasos 2-4 tras haber aleatorizado la asignación de correspondencia entre los valores de strength y los participantes. Para cada repetición, se retuvo el clúster significativo con mayor estadístico de clúster, generando, de esta forma, una distribución nula de 5000 valores de clústeres significativos máximos aleatorios. El uso de una distribución nula de estadísticos de clúster máximos asegura el control del FWER para el clúster obtenido como un único elemento, pero no para cada uno de los valores individuales pertenecientes a los nodos que lo conforman.
6. El valor de significación corregido para cada uno de los posibles clústeres significativos iniciales se calculó como la proporción de la distribución nula con valores mayores o iguales al correspondiente estadístico del clúster inicial. Solo aquellos clústeres con valores de p corregidos menores que 0,05 fueron considerados como resultados significativos. Para cada uno de los clústeres significativos se obtuvo un valor de strength global calculado mediante el promedio de los valores de strength de los nodos que conformaban el clúster. Estos valores fueron empleados en nuevas correlaciones parciales con los valores de PRG de forma que se pudiera obtener un valor global de la correlación entre la CF media global de la región definida por el clúster y dichos valores de PRG.

5.3 Resultados

5.3.1 Conectividad Funcional

En primer lugar, en la tabla 5.1, se muestran las características de las participantes donde podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en edad, nivel educativo, rendimiento neuropsicológico o volúmenes de hipocampo, corteza entorrinal y/o parahipocampo.

Los resultados de CF en relación a las PRGs muestran una disminución de dicha CF (hiposincronización) cuanto mayor es la PRG entre los nodos de los clústeres representados en color azul en las bandas delta, theta y beta2 (Figuras 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8). A continuación, se describen los resultados hallados para cada una de las bandas de frecuencia de manera más detallada.

Banda Delta (1-4 Hz)

Como se puede observar en la figura 5.3, las regiones cerebrales afectadas para esta banda son los giros temporal inferior ($p = 0,0043$) y temporal medial ($p = 0,0064$) derechos, el giro lingual derecho ($p = 0,0027$), el giro fusiforme derecho ($p = 0,0033$) y parte del lóbulo occipital inferior ($p = 0,0016$) y occipital medial ($p = 0,0054$) derechos.



Figura 5.3. Regiones cerebrales afectadas para el cluster obtenido en la banda delta.

Asimismo, en la gráfica de correlaciones (figura 5.4) se evidencia una correlación negativa significativa entre la CF media y la PRG para toda la muestra de estudio ($\rho = -0,33$; $p = 0,00263$), donde a mayor PRG se da una menor CF. Si tenemos en cuenta la estratificación de la muestra en portadores y no portadores del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*, podemos observar que esta correlación solamente es significativa para los *APOE* $\epsilon 4$ negativos ($\rho = -0,36$, $p = 0,00332$).

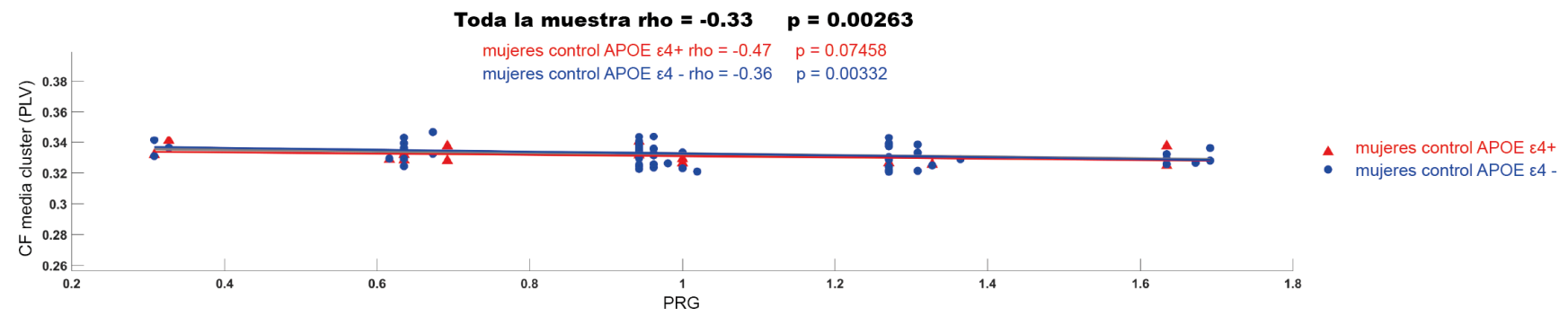


Figura 5.4. Correlación entre la CF media del cluster en la banda delta y la PRG en mujeres ancianas sanas.

Banda Theta (4-8 Hz)

Como se puede observar en la figura 5.5, las regiones cerebrales afectadas para esta banda son los giros temporal inferior ($p = 0,0020$), temporal medial ($p = 0,0057$) y temporal superior ($p = 0,0080$) izquierdos, el hipocampo ($p = 0,0065$) y parahipocampo ($p = 0,0029$) izquierdos, el giro fusiforme izquierdo ($p = 0,0017$) y la ínsula izquierda ($p = 0,0091$).

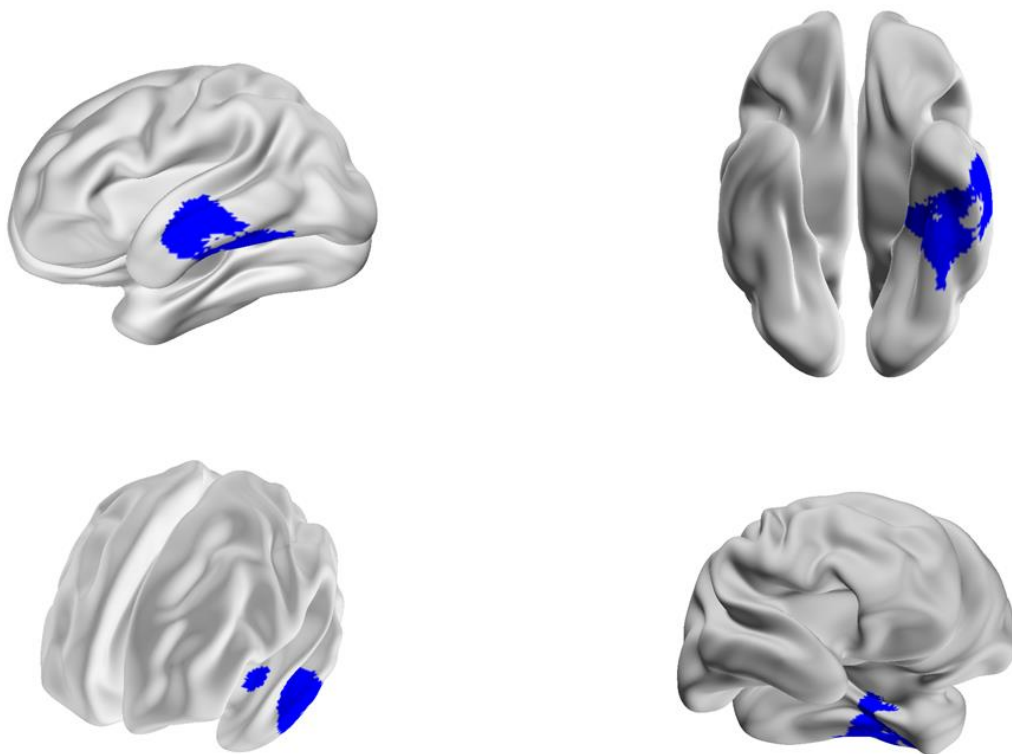


Figura 5.5. Regiones cerebrales afectadas para el cluster obtenido en la banda theta.

Con respecto a la correlación entre la CF y la PRG se observa el mismo patrón obtenido para la banda delta, es decir, una relación negativa significativa entre la CF media y la PRG para toda la muestra de estudio ($\rho = -0,39$; $p = 0,00028$), donde a mayor PRG se produce una menor CF (figura 5.6). Si tenemos en cuenta la estratificación de la muestra entre portadoras y no portadoras del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*, podemos observar que esta correlación también se mantiene significativa para

ambos grupos: *APOE* $\epsilon 4$ positivos ($\rho = -0,57$, $p = 0,026$) y *APOE* $\epsilon 4$ negativos ($\rho = -0,34$, $p = 0,0056$). Teniendo en cuenta esto y que asociado al valor de la correlación parece observarse una mayor disminución de la CF en los *APOE* $\epsilon 4$ positivos que en los negativos, se procede a realizar un ANOVA para determinar si existe interacción entre ser portador y no portador del alelo $\epsilon 4$ y la PRG. El resultado del análisis demuestra que, aunque existe un efecto significativo atribuible a la PRG ($p = 0,018$, $F = 2,139$), no existe interacción entre ser portadora o no portadora del alelo $\epsilon 4$ y la PRG ($p = 0,387$, $F = 1,086$).

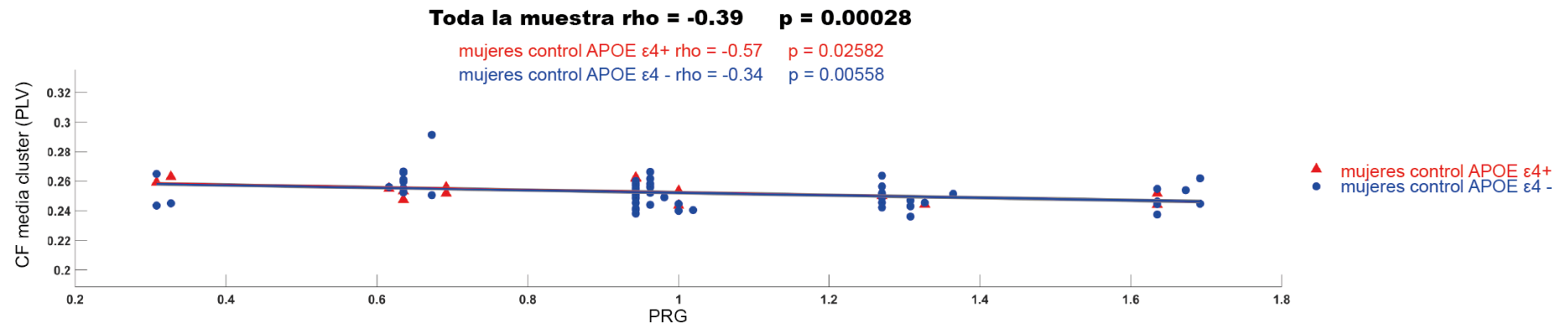


Figura 5.6. Correlación entre la CF media del cluster en la banda theta y la PRG en mujeres ancianas sanas.

Banda Beta 2 (21-30 Hz)

Por último, como se puede observar en la figura 5.7, las regiones cerebrales afectadas para esta banda son los giros postcentral ($p = 0,0034$), precentral ($p = 0,0072$) y parietal inferior ($p = 0,00045$) derechos.

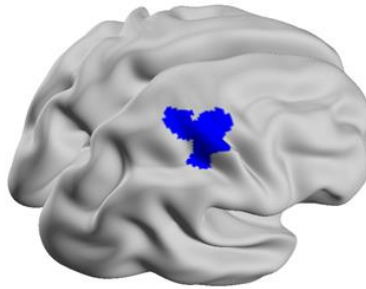


Figura 5.7. Regiones cerebrales afectadas para el cluster obtenido en la banda Beta 2.

El resultado de la correlación entre la CF y la PRG es el mismo que para las bandas delta y theta: se produce una correlación negativa significativa entre la CF media y la PRG para toda la muestra de estudio ($\rho = -0,38$; $p = 0,00048$), donde a mayor PRG se da una menor CF (figura 5.8). Si tenemos en cuenta la estratificación de la muestra entre portadoras y no portadoras del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*, podemos observar que esta correlación también se mantiene significativa para ambos grupos: *APOE* $\epsilon 4$ positivos ($\rho = -0,62$, $p = 0,014$) y *APOE* $\epsilon 4$ negativos ($\rho = -0,29$, $p = 0,020$), de modo que, al igual que en el caso de la banda theta, se procede a realizar un ANOVA para determinar si existe interacción entre ser portadora y no portadora del alelo $\epsilon 4$ y la PRG. El resultado del análisis demuestra que no existe interacción entre ser portadora o no portadora del alelo $\epsilon 4$ y la PRG ($p = 0,545$, $F = 0,873$).

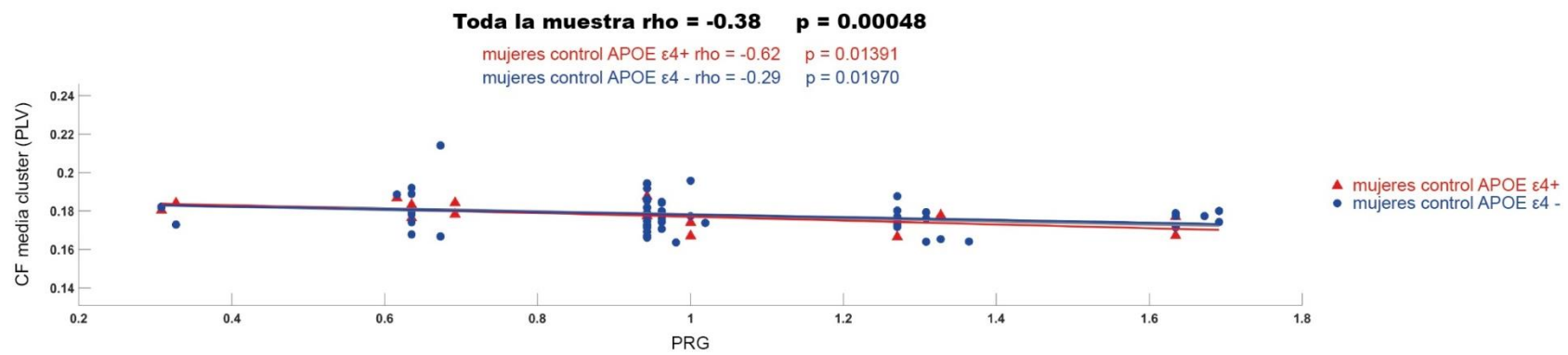


Figura 5.8. Correlación entre la CF media del cluster en la banda beta 2 y la PRG en mujeres ancianas sanas.

5.3.2 Volumetrías y pruebas cognitivas

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la PRG y las pruebas neuropsicológicas y/o las volumetrías cerebrales.

5.4 Discusión

El presente estudio demuestra una disminución de la CF en mujeres ancianas sanas con factores de riesgo genético de EA. En concreto, esta disminución de la CF es mayor cuanto mayor es la PRG obtenida, es decir, el ser portador de los alelos de riesgo de los SNPs de los genes *CLU*, *PICALM* y *CRI*, podría indicar que la transmisión sináptica entre neuronas está fallando como consecuencia de la afectación del metabolismo lipídico, el estrés oxidativo, la respuesta del sistema inmune, los mecanismos de endocitosis y/o, en menor medida, la acumulación de proteína β -amiloide (Elias-Sonnenschein, Bertram, & Visser, 2012; Guerreiro et al., 2013a; Head et al., 2012; Jones et al., 2010; Karch & Goate, 2015; Morgan, 2011; Nuutinen, Suuronen, Kauppinen, & Salminen, 2009; Pimenova et al., 2018; Schjeide et al., 2011). Desde nuestro conocimiento, este es el primer estudio realizado con MEG en el que se hace un abordaje de este tipo. No obstante, ya existen diversas investigaciones donde se ha considerado el efecto acumulado de varios o multitud de SNPs de riesgo de EA en población anciana sana y su relación con alteraciones a nivel cognitivo, estructural o funcional a lo largo del continuum de dicha patología.

Desde el punto de vista cognitivo Verhareen et al. (2013) encontraron que una PRG en la que, además de otros, se incluían los 3 SNPs contemplados en este estudio, predecía cambios en el funcionamiento cognitivo global y de memoria con respecto a una línea base, pero que tras excluir al gen *APOE* de la PRG, esta asociación dejaba de ser significativa. Por su parte, Carrasquillo et al. (2015) además de confirmar cambios en la memoria (recuerdo demorado) durante un periodo de 5 años, también observaron un mayor riesgo de conversión a DCL.

A nivel estructural, Harrison et al., (2016) advirtieron que una mayor PRG de EA estaba asociada con el adelgazamiento del hipocampo tras dos años de seguimiento de los participantes del estudio. En la misma línea Chauhan et al. (2015), observaron que una mayor PRG correlacionaba con un menor volumen de hipocampo, resultado que, por otro lado, seguía siendo significativo una vez excluido el efecto negativo del

alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*. En otro estudio donde se incluyeron alrededor de 26 SNPs relacionados con el riesgo de EA en una única PRG, se demostró que ésta predecía un adelgazamiento cortical en regiones vulnerables a la EA como la corteza entorrinal o el cíngulo posterior, en individuos homocigotos $\epsilon 3\epsilon 3$ para el gen *APOE* y con niveles normales de proteína amiloide en líquido cefalorraquídeo (Sabuncu et al., 2012). Finalmente, en una investigación llevada a cabo por Mormino et al. (2016) donde también se combinaron diferentes marcadores de EA, se observó una asociación entre mayores PRG (donde se incluyen más de 16123 SNPs), con un peor funcionamiento de la memoria, menor volumen de hipocampo, y más acúmulo de proteína β -amiloide. Además de eso, estos autores encontraron que mayores PRG producían mayores cambios en memoria y funciones ejecutivas, así como un aumento del riesgo de progresión a EA a lo largo del tiempo.

Sin embargo, aún existen pocos trabajos que hayan tenido en cuenta el efecto de una PRG sobre los cambios a nivel funcional o neurofisiológico. En uno de los más recientes, Xiao et al. (2017) detectaron un efecto perjudicial de la PRG sobre la función del hipocampo en una muestra de participantes de 19 a 55 años, donde tanto el gen *APOE*, como variantes genéticas del gen *CLU* y *PICALM* del total de los 29 SNPs considerados en el cálculo de la PRG, parecieron tener un papel fundamental sobre dicha alteración. Además, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la PRG y el rendimiento cognitivo y/o la morfometría cerebral.

En la presente investigación, el que la mayor parte de la CF se vea disminuida en regiones temporales, podría equipararse a los hallazgos descritos por Xiao et al. (2017), aunque en nuestra muestra la edad media de los participantes es algo mayor (alrededor de los 70 años). De hecho, la afectación de la CF de áreas temporales mediales, va en línea con el lugar donde aparecen las primeras lesiones de la EA, especialmente el hipocampo, cuya CF con otras regiones cerebrales como por ejemplo el cíngulo posterior, precúneo, córtex parietal y córtex prefrontal medial, se ha visto significativamente reducida en pacientes con EA (Sorg et al., 2007; Hart, Cribben, & Fiecas, 2018) al igual que durante las fases preclínicas de la misma (Zhan, Wang, Zhou, Yuan, & Shen, 2011). Además de las regiones temporales, también hemos encontrado una disminución de la CF de más áreas vulnerables a la EA como son las zonas parietales inferiores (Cuesta et al., 2015; Wu et al., 2011). De igual modo, el que

de todas las regiones representadas en la figura 5.1, la PRG acumulado de los 3 SNPs parezca confluir de forma más marcada sobre la región del hipocampo (zona sombreada de color verde) apoya el papel central que esta estructura tiene en el comienzo temprano de la EA en personas cognitivamente intactas (Chiesa et al., 2017), hallazgo verdaderamente interesante teniendo en cuenta el carácter preclínico de la muestra de estudio del presente trabajo. Al igual que se ha sugerido en otros trabajos, este resultado también se ve apoyado por la ausencia de correlación entre la PRG y el rendimiento cognitivo o los cambios en la volumetría cerebral (Darst et al., 2017; Ferencz et al., 2014, Foley et al., 2018, Xiao et al., 2017) algo que, por otra parte, podría ser plausible teniendo en cuenta que la aparición de los primeros síntomas cognitivos parece darse una vez se han producido daños estructurales en la corteza entorrinal (Braak & Braak, 1996) y, que por lo tanto, estarían más asociados con estadios más avanzados de la EA.

Otro resultado a resaltar tiene que ver con el hecho de que el ser portador de los alelos de riesgo de los SNPs de los genes *CLU*, *PICALM* y *CRI* es suficiente como para producir una disminución de la CF independientemente del efecto del gen *APOE*. Esto por un lado indica que aunque los SNPs por separado tienen un efecto menor al que podría tener el gen *APOE* por sí solo, cuando son incluidos en una PRG tienen el suficiente peso como para poder ejercer un efecto significativo (Escott-Price et al., 2015) y, por otro, que a pesar de que el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* es uno de los factores de riesgo más importantes para la EA, más de la mitad de la población que padece dicha enfermedad no son portadores de este alelo de riesgo y, aun así, siguen teniendo susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.

Por lo tanto, podríamos concluir que además del gen *APOE* existen otras variantes genéticas cuyo efecto acumulado parece generar cambios a nivel neurofisiológico en una muestra de mujeres ancianas sanas que no presentan demencia. Además, es probable que estos factores de riesgo genético comiencen a ejercer su acción en etapas tempranas de la vida (Mormino et al., 2016), por lo que podrían servir como biomarcadores precoces de la EA complementarios a los ya existentes e incluso podrían suponer una alternativa para aquellas personas que no son portadoras del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* pero que sí son portadoras de alelos de riesgo de otras variantes genéticas. En definitiva, el poder estadístico de una PRG no solo parece ser exponencialmente mejor que el de un único SNP, sino que también apunta hacia un

cambio de paradigma en el campo de estudio de la neurogenética y, que sin duda, ha de ser considerado en futuras investigaciones (Dima & Breen, 2015; Foley et al., 2018).

5.4.1 Limitaciones y líneas futuras

Algunas de las limitaciones que podría tener el presente trabajo es que la muestra de participantes no es muy grande. Sin embargo, una de las ventajas de la propia PRG es precisamente contrarrestar esta posible limitación: al calcularse el efecto agregado de varios genes, permite llevar a cabo el estudio de su efecto en muestras más pequeñas que si se hubiera estudiado el impacto del SNP de forma aislada (Dudbridge, 2013; Kohannim et al., 2013; Purcell et al., 2009; Sklar et al., 2011). De igual modo, el cálculo de una PRG continua como la del presente estudio supone una aproximación metodológica más acertada que dividir dicha puntuación en tertiles o no considerar los pesos u OR de cada uno de los alelos de riesgo o de protección sometidos a estudio (Lacour et al., 2017). Aun así, no deja de ser una asociación aditiva en la que no se han tenido en cuenta las interacciones genéticas, algo que convendría examinar de manera más pormenorizada con el fin de entender la biología subyacente a la EAOE con mayor detalle (Ebbert et al., 2014).

Por otro lado, el número de SNPs utilizados en este estudio (3 vs. cientos o millones de ellos) es ínfimo en comparación a los utilizados en otros trabajos (Cruchaga et al., 2018; Sabuncu et al., 2012; Ridge et al., 2013, 2016). No obstante, es algo que al mismo tiempo resulta valioso, ya que con una PRG de 3 SNPs se ha obtenido una aproximación interesante a partir de la cual se podría seguir investigando. Es más, la justificación del por qué con tan solo unos pocos SNPs se siguen obteniendo resultados significativos podría verse respaldada de algún modo por el trabajo llevado a cabo por Han et al. (2017). En él los autores realizan un análisis funcional de genes relacionados con la EA identificados en los GWAS y que consiste en definir la función molecular de cada uno de ellos, su localización, las proteínas que codifican, así como las relaciones/interacciones que puedan existir entre los mismos. De este modo y de manera muy similar al parámetro de strength utilizado en CF cerebral se obtienen dos tipos de resultados: a) genes que actúan como hubs, es decir, genes que están altamente conectados con otros genes además de ejercer de “centro de control funcional” y b)

genes con efecto de cuello de botella (bottleneck genes en inglés) que suelen estar más directamente conectados con subredes funcionales además de restringir el flujo de información (ver figura 5.9). En este sentido, los 3 genes considerados en este estudio, *CLU*, *PICALM* y *CRI* (también el gen *APOE*) son algunos de los genes que han sido identificados como genes hubs, bottleneck o ambos, en la investigación de Han et al. (2017). Es por ello que podríamos decir que independientemente del número de SNPs que se incluyan, si dichos SNPs forman parte de genes cuyo efecto tiene un rol principal sobre la red funcional (figuras 5.10 y 5.11), los posibles hallazgos derivados de ello pueden llegar a ser lo suficientemente significativos como para tenerlos en consideración. Otra cosa es que se desee profundizar sobre si cierto número de SNPs pueden tener una funcionalidad compartida y cuánto peso podrían tener sobre el desarrollo de una determinada enfermedad en comparación con la acción biológica de otro grupo de SNPs diferente. En este sentido y en ese contexto específico, es probable que sea necesario disponer de cuantos más SNPs mejor para establecer una discriminación lo más acertada posible.

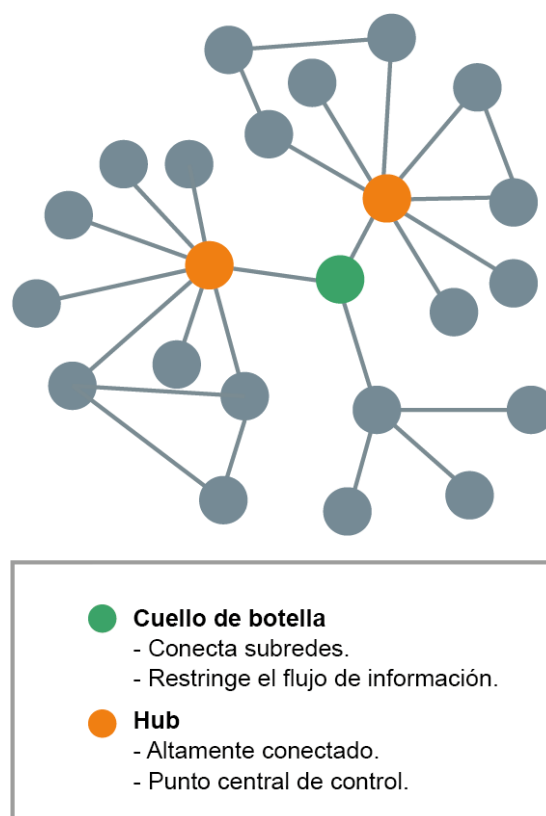


Figura 5.9. Gen cuello de botella (bottleneck gene) representado por un nodo o círculo verde y dos genes hub (nodos naranjas) de una red genética funcional hipotética. Los hubs están altamente conectados a otros nodos de la red. Los genes cuello de botella tienen un alto grado de

intermediación (*betweenness centrality*), medida que cuantifica la frecuencia o el número de veces que un nodo actúa como un puente a lo largo del camino más corto entre otros dos nodos o subredes. Además, su contribución depende principalmente de la ubicación que tengan en la subred independientemente de si se está evaluando su importancia, influencia, relevancia o prominencia (Adaptado de Law, Korth, Benecke, & Katze, 2013).

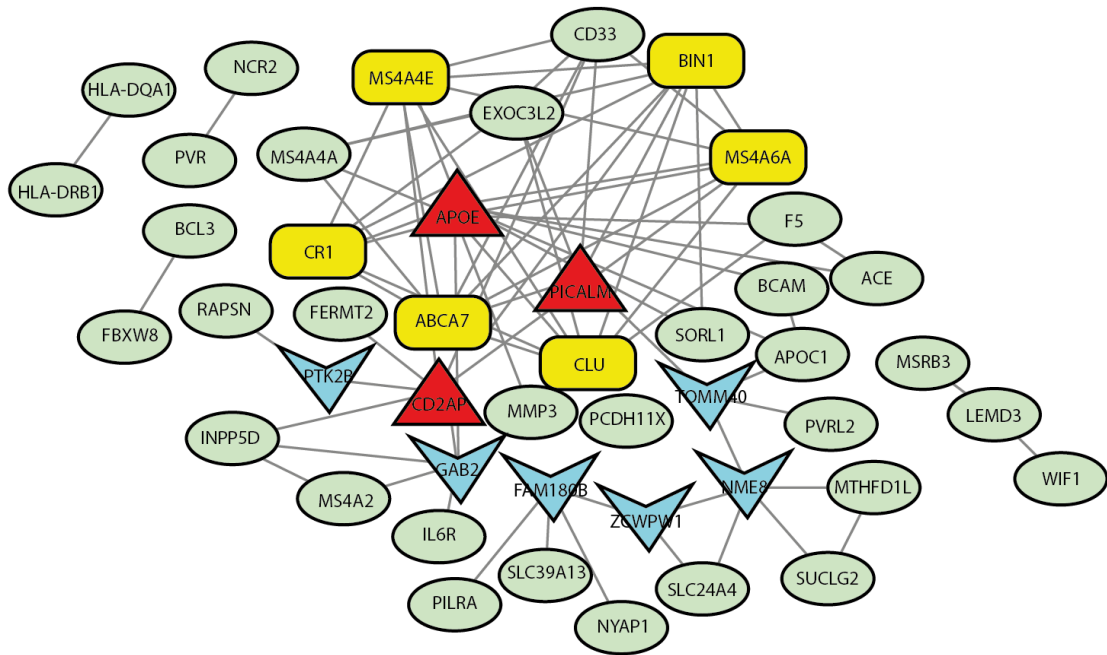


Figura 5.10. Red de interacción de genes asociados con la EA. Las distintas figuras geométricas (nodos) y las líneas de conexión representan los genes y sus interacciones respectivamente. En color amarillo se representan los genes hub, entre los que tenemos el *CLU* y el *CR1*. En color azul aparecen los genes cuello de botella. Por último, en color rojo tenemos genes que poseen ambas funciones (hub o cuello de botella) como el *APOE* y el gen *PICALM* (Adaptado de Han et al., 2017).

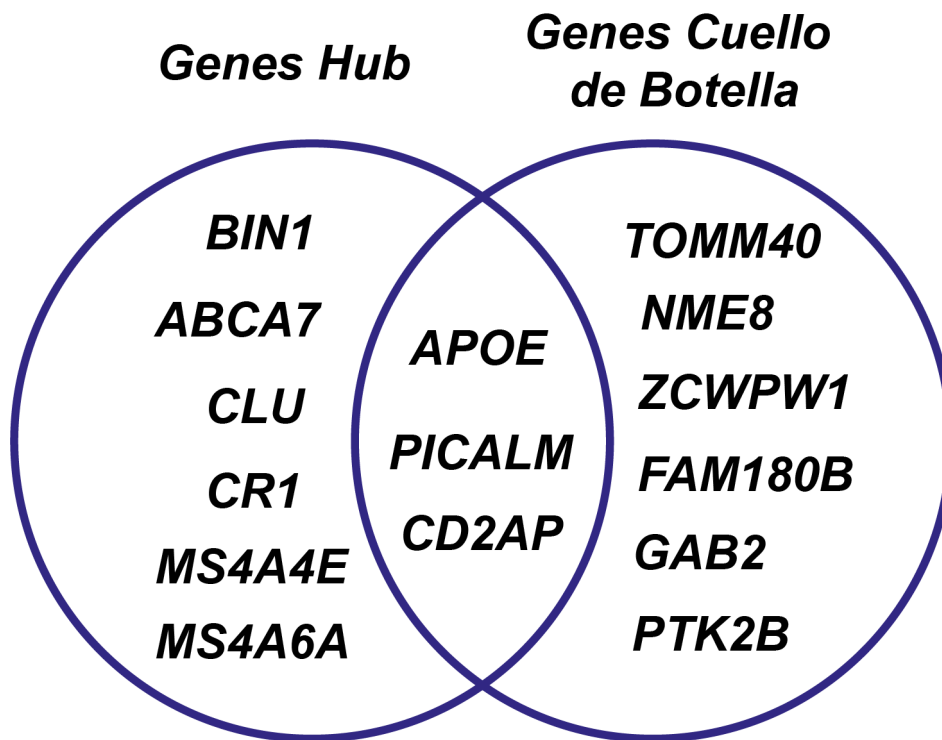


Figura 5.11. Genes hub, cuello de botella y/o ambos tipos con el grado de asociación/interacción más alto. Por ejemplo, el gen *APOE* tiene un degree de 16, seguido del gen *PICALM* con un 14 y, finalmente, de *CLU* y *CR1* con un 9 (Adaptado de Han et al., 2017).

Tampoco disponemos de información relativa a otros biomarcadores como podría ser el acúmulo de proteína β -amiloide. No obstante, según Doraiswamy et al. (2014), se estima que el 14% de los ancianos cognitivamente intactos (con una edad media aproximada de 72,5 años) son amiloide positivo. Asumiendo que esta estimación es más o menos precisa, alrededor de 11-12 (11,34) participantes del presente estudio con una media de edad muy parecida a la del estudio de Doraiswamy y colaboradores (70,3 años), podrían ser amiloide positivo, un número que, a priori, no parece ser excesivamente elevado y donde quizás aún dispondríamos de suficientes personas amiloide negativo como para seguir detectando un efecto estadísticamente significativo entre la PRG y la disminución de la CF.

De igual modo y, aunque una PRG podría englobar más información relativa a la arquitectura genética de la EA (Lambert et al., 2013; Harrison et al., 2016; Dima & Breen, 2015; Dudbridge, 2013; Escott-Price et al., 2015, 2017; Tosto et al., 2017; Lupton et al., 2016), aún quedan muchos SNPs por estudiar de los cuales se desconoce

su función y, que a pesar de no alcanzar los niveles de significación estadística requeridos para ser considerados genes candidatos de EA en los GWAS, también han demostrado tener su efecto en la susceptibilidad a la EA (Benitez & Cruchaga 2013; Guerreiro et al., 2013b). En realidad, cada vez son más los estudios que calculan diferentes PRG en base a diferentes umbrales de significación estadística ($p < 10^{-4}$, $p < 10^{-3}$, etc.) para la selección de los SNPs, dejando un poco al margen los valores de significación más restrictivos impuestos al inicio y, que por lo tanto, limitaban el número de SNPs a elegir (Lupton et al., 2016). Además, y teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es conveniente calcular PRG no solo considerando diferentes niveles de significación estadística, sino también en base a SNPs que actúen sobre vías moleculares específicas (metabolismo lipídico, respuesta inmune, endocitosis, ubiquitinación de proteínas, aclaramiento de proteína β -amilode, etc.) para poder determinar con mayor detalle qué rutas son las que más peso podrían tener en la susceptibilidad a la EA, así como cuáles son las que antes comienzan a ejercer su efecto en las fases preclínicas de la misma y, donde la prevención, es aún posible (Darst et al., 2017; Jones et al., 2015). Es por ello que, una vez más, los estudios longitudinales siguen siendo absolutamente necesarios para abordar la importancia neurobiológica que podrían suponer tales hallazgos (Ferencz et al., 2014; Foley et al., 2018; Verhaaren et al., 2013).

6. REFLEXIONES FINALES

Tras los resultados obtenidos en los diferentes estudios propuestos, se ha podido observar el papel diferencial que determinados factores de riesgo genético tienen sobre la mayor o menor vulnerabilidad a padecer EA en una muestra de ancianos sanos. En este caso, además de estudiar el gen *APOE*, cuyos efectos sobre el envejecimiento, la cognición y determinadas patologías ha sido extensamente investigado en multitud de trabajos (Walhovd, Fjell, & Espeseth, 2014), uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral ha consistido en otorgar cierto grado de protagonismo a otras variantes genéticas (como las de los genes *BDNF*, *CLU*, *PICALM* y *CRI*) que, a pesar de ser también conocidas, la información relativa a sus posibles efectos a nivel cognitivo, estructural y/o neurofisiológico (sobre todo con respecto a este último aspecto), es algo más escasa.

Así pues y gracias al enfoque preclínico del presente trabajo de investigación, se ha podido realizar un pequeño acercamiento hacia la comprensión del posible impacto que algunos factores de riesgo genético podrían tener sobre el potencial desarrollo de EA a nivel cognitivo y neurofisiológico. Asimismo, los hallazgos encontrados promueven la necesidad de apostar hacia el desarrollo una medicina personalizada en beneficio de aquellos individuos con un riesgo más alto de EA (Foley et al., 2018) y donde el peso de otros factores de vida modificables adicionales al entrenamiento cognitivo, como por ejemplo la nutrición, la actividad física, el consumo de tabaco y alcohol o determinadas condiciones médicas (hipercolesterolemia, hipertensión, niveles elevados de estrés, obesidad, diabetes, composición de la microbiota intestinal, etc.), han de ser tenidos en cuenta para llevar a cabo una prevención precoz del desarrollo de cualquier tipo de demencia (Imtiaz et al., 2014; Mendiola-Precoma et al., 2016; Nelson & Tabet, 2015; Robinson, Lee, & Hane, 2017).

Si además de ello dichos factores fueran combinados con diferentes marcadores neuropatológicos, genéticos, epigenéticos (Bennet et al., 2017; Darst et al., 2017; Mastroeni et al., 2011; Mormino et al., 2016; Slegers et al., 2015) y/o de neuroimagen (Chiesa et al., 2017; Walsh et al., 2017), se podría obtener una aproximación multiescala “casi perfecta” que posibilitara un mejor entendimiento de una enfermedad que no solo es devastadora para el paciente, sino también para su familia. No obstante, a

día de hoy e incluso teniendo un conocimiento más profundo de algunos de estos factores de riesgo, los investigadores continúan descubriendo nuevos agentes candidatos que, una vez más, solo nos sirven para constatar la complejidad de dicha enfermedad y la extrema dificultad de su tratamiento (Cai & Gaamouch, 2016).

Puede que aún quede un largo camino por recorrer, pero por la parte que respecta a esta tesis doctoral, se han podido extraer una serie de consideraciones o sugerencias que, a modo de conclusión, podrían servir de guía para mejorar el presente trabajo así como los estudios venideros. Algunas de ellas son las siguientes:

- Impulsar el desarrollo de las nuevas tecnologías genéticas donde además de los GWAS se tengan en cuenta la exploración de los genomas o exomas completos en función del tipo de información que se desee obtener (Shao, Peng, & Wang, 2017). Esto es especialmente interesante cuando algunos de los SNPs sometidos a estudio son de origen intrónico como el SNP rs11136000 del gen *CLU* o el SNP rs6656401 del gen *CRI*. Es decir, SNPs que a pesar de poder intervenir en la regulación génica de la expresión de proteínas (Orr & Chanock, 2008), no afectan ni a su estructura ni a su función (Harold et al., 2009). Así pues, la información contenida en los exomas podría ser (a priori) la más adecuada al contener “los verdaderos SNPs causales” que subyacen a las correlaciones u asociaciones entre aquellas variables de interés que se estén estudiando en un momento determinado. En la misma línea, el disponer de más información sobre los entresijos del genoma humano podría ser igualmente relevante para comprender el papel de determinados genes que se encuentren en la vecindad de otros. Esto es algo que ha sido más ampliamente estudiado para aquellos genes en la vecindad de *APOE* como *TOMM40*, *ABCA7* o *CD33* (Roses et al., 2010; Moreno-Grau et al., 2018), lo que podría implicar que quizás los efectos otorgados a dicho gen podrían estar mediados o influidos por otros genes que se encuentran en su mismo locus o que podrían estar en desequilibrio de ligamiento con él (es decir, alelos de dos SNPs presentes en el mismo cromosoma y que pueden heredarse juntos), algo que, a su vez, podría ser igualmente extrapolable al resto de SNPs sometidos a estudio en la presente tesis doctoral.

- Realizar estudios longitudinales no solo por el posible antagonismo pleiotrópico de los genes (Haan & Mayeda, 2010; Jochemsen et al., 2012; Li et al., 2010; Mondadori et al., 2007; Nilsson et al., 2006; Stening et al., 2016; Stevens et al., 2014; Voineskos et al., 2011; Williams, 1957), sino para que, en base a esto, se pueda evaluar el impacto de determinadas terapias de estimulación cognitiva antes, durante y a lo largo del continuum de la EA, con el fin de comprobar el momento más apropiado para llevar a cabo este tipo de intervenciones, los posibles hallazgos neurofisiológicos que pudieran derivarse de ello, así como qué pruebas o tareas cognitivas a administrar serían las más recomendables.
- Tener en cuenta la inclusión de variantes genéticas menos comunes o raras entre la población como las del gen *TREM2* pero que pueden incrementar el riesgo de padecer EA entre 3 y 4 veces (Guerreiro et al., 2013b; Jonsson et al., 2013), o las del gen *SORL1*, que no solo aumentan el riesgo de EAOE, sino también los casos de EA autosómicos dominantes o de origen familiar (los denominados como EAOF en la introducción general; Miyashita et al., 2013; Pottier et al., 2012; Rogaeva et al., 2007). En el caso que nos ocupa, solamente se ha podido realizar el genotipado de unos pocos genes, pero, si idealmente se pudiera tener acceso a un estudio del genoma completo de cada uno de los participantes, se dispondría de la oportunidad de profundizar en el desarrollo una medicina personalizada en la que no solo se tuvieran en cuenta las rutas moleculares de interés (neuroinflamación, metabolismo del colesterol, etc.; Darst et al., 2017; Jones et al., 2015) en base a la evaluación de un determinado proceso cognitivo o un daño neurofisiológico concreto circunscrito a una región cerebral específica (como por ejemplo el hipocampo), sino también las interacciones entre distintos genes (epistasia) o entre los genes y el propio ambiente (Ebbert et al., 2014).
- Perfeccionar los estudios en los que se tengan en cuenta PRG, ya que aunque parecen mejorar el valor predictivo del riesgo de padecer EA (Dima & Breen, 2015; Dudbridge, 2013; Escott-Price et al., 2015, 2017; Harrison et al., 2016; Jones et al., 2010; Lambert et al., 2013; Lupton et al., 2016; Tosto et al., 2017), Cruchaga y colaboradores (2018) han encontrado que aquellos individuos con EAOE temprano, es decir, personas que no tienen mutaciones genéticas de origen mendeliano de la EA (es decir, los EAOF), pero que son más jóvenes en

comparación con los individuos de EAOE per se, tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. De igual modo, también observaron que a estos individuos más jóvenes les seguían aquellos otros con antecedentes familiares de EA, lo que por un lado evidencia que la edad sigue siendo un factor de riesgo crucial para sufrir dicha patología y, por otro, el compromiso de realizar futuras investigaciones en las que se incluyan participantes con historia familiar de EA constatada (Harrison et al., 2016; Sleegers et al., 2015).

- En línea con el punto anterior y, especialmente en lo que se refiere a los factores de riesgo no modificables como la edad, sería interesante tener en cuenta también las diferencias de sexo. Ya existen algunos trabajos en los que se ha revisado esta cuestión con respecto al gen *APOE* o *BDNF* desde el punto de vista neuropatológico, cognitivo, estructural y/o funcional (Riedel et al., 2016; Fisher et al., 2018), pero el contemplar el estudio de otros genes en relación a este aspecto podría resultar igualmente atractivo. Asimismo, el hecho de que dos de los estudios de la presente tesis doctoral se hayan llevado a cabo únicamente en mujeres ancianas no solo viene motivado por su mayor predisposición a desarrollar EA (Barnes et al., 2005; Fisher et al., 2018; Fleisher et al., 2005; Neu et al., 2017), sino también porque la muestra de varones disponibles era insuficiente como para poder obtener resultados más o menos concluyentes.
- Calcular las OR de los alelos de riesgo de nuestra propia muestra de estudio. En primer lugar, porque en función de las OR seleccionadas (bases de datos de Alzgene vs. IGAP) se pueden obtener resultados diferentes. En segundo lugar, porque para realizar dicho cálculo se podrían haber tenido en cuenta otras variables de interés como el sexo, la edad, etc., que hubieran permitido obtener una medida más fiable del riesgo de EA. En tercer lugar y a pesar de que en una muestra de estudio pequeña como la nuestra no es del todo desacertado haber hecho uso de los riesgos observados del IGAP al ser el consorcio de referencia para los estudios de casos y controles de EA en población caucásica, dichos estudios conllevan como limitación la posibilidad de haber cometido errores en la selección de los mencionados casos y controles, así como haber obtenido una sobrerrepresentación de la población clínica con el consiguiente aumento de la presencia de alelos de riesgo en la misma (Ebbert et al., 2014; Ge et al., 2018).

En cuarto y último lugar, este cálculo de las OR se puede extrapolar a aquellos casos en los que se han estudiado diferencias entre razas o etnias y donde no se ha obtenido el suficiente poder estadístico como para explicar los hallazgos encontrados en población de raza negra, ya que, la gran mayoría de los GWAS, se han llevado a cabo en raza blanca (Marden et al., 2016).

- Mejorar la sensibilidad de las medidas de rendimiento cognitivo obtenidas en los tests neuropsicológicos en poblaciones preclínicas (Erk et al., 2011; Harrison et al., 2016; Sabuncu et al., 2012), ya que en ninguno de los estudios neurofisiológicos realizados se han observado efectos significativos que correlacionen con dichos valores.
- Por otro lado, y a pesar de que la CF continúa siendo una de las medidas más utilizadas en los estudios de resting-state (Sala-Llonch et al., 2015), aún no existe evidencia suficiente como para poder afirmar que un determinado patrón de CF pueda servir como predictor de la posible progresión a EA (Dubois et al., 2016). Ejemplo de ello son los patrones duales de activación en los que se ha constatado un aumento de la CF en regiones anteriores (afectando a las conexiones entre el giro cingulado, regiones frontales y áreas temporales anteriores) y una disminución de la CF en regiones cerebrales posteriores (que incluyen estructuras mediales-temporales, parietales o regiones occipitales). Dichos hallazgos han sido predominantemente encontrados en personas con DCL (Canuet et al., 2015; López-Sanz et al., 2017a) o individuos con quejas cognitivas subjetivas (López-Sanz et al., 2017b), síndrome heterogéneo sobre el que no existe consenso, donde la persona manifiesta quejas cognitivas (especialmente mnésicas), sin déficits significativos en los tests neuropsicológicos, pero que podrían representar el estadio más precoz de EA (Garcia-Ptacek et al., 2016; Jessen et al., 2014). Puesto que el patrón de decremento de activación cerebral mencionado es similar al encontrado en el estudio de PRG en mujeres ancianas sanas (es decir, disminución de la CF en regiones temporales mediales, parietales inferiores y occipitales), sería interesante llevar a cabo un estudio semejante en los estadios o poblaciones referidas, con el fin de establecer si la hiposincronización observada pudiera estar mediada por la carga genética de los individuos, y, donde quizás, aquellos

con un índice de riesgo genético mayor, pudieran ser los más proclives a evolucionar/manifestar esa hipersincronización adicional más típica de las etapas intermedias de la enfermedad. De confirmarse algo así, el hecho de que exista una mayor disminución de la CF en los portadores de factores de riesgo genético de EA frente a los no portadores podría servir como posible predictor del desarrollo del patrón dual mencionado y por lo tanto de una mayor predisposición a padecer la enfermedad.

- Asimismo y para finalizar, el estudio de la conectividad efectiva encargada de describir las interacciones reales (o causales) entre distintas áreas cerebrales (Pallarés et al., 2018), así como las interacciones dinámicas entre diferentes áreas o regiones mediante el uso de redes funcionales multicapa que tengan en cuenta cómo ciertas frecuencias cerebrales pueden afectar o interactuar con otras (Buldú & Porter, 2017), o los algoritmos de machine learning (Klöppel et al., 2008; Martínez-Ballesteros, García-Heredia, Nepomuceno-Chamorro, & Riquelme-Santos, 2017; Zhang, Wang, Zhou, Yuan, & Shen, 2011), se convierten en aproximaciones futuras que, junto con la CF, podrán ayudar a comprender las reorganizaciones funcionales que se dan a lo largo del proceso de envejecimiento tanto normal como patológico, así como a lo largo de todo el ciclo vital de los individuos.

7. CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the three studies it could be concluded that:

- The administration of a CT intervention in a sample of CI older adults revealed that there were consistent treatment benefits in complex sentence comprehension (non-canonical sentences and sentences with two propositions), a domain that was not directly trained, but only in the *APOE* $\epsilon 4$ non-carrier group.
- The first study reports the relevance of establishing and implementing CT programs that not only incorporate multiple strategies and a great variety of tasks that could improve cognitive functioning as well as producing greater transfer effects, but also how that potential benefits could be influenced by the individual's genetic load in order to develop the most adequately prevention therapies to effectively protect those at increased risk of AD.
- After a resting-state FC MEG study in a sample of CI older females, the data showed a reduced antero-posterior gamma band FC within the Val/Met genetic risk group, which may be caused by a GABAergic network impairment.
- Additionally, in a similar MEG study with another sample of CI older females where a PRS was taken into account, results indicated that the higher the PRS the lower the FC for the delta, theta and beta 2 frequency bands. These outcomes were particularly significant within some brain regions vulnerable to AD such as the medial temporal or the inferior parietal cortices.
- The second and the third studies demonstrate that multimodal analyses, combining MEG FC and genetics, offer valuable information in the assessment of possible selective brain network vulnerabilities associated with the beginning of the complex continuum from healthy to pathological aging. Furthermore, the non-invasiveness of MEG may be also useful as a surrogate endpoint for monitoring the effects of future pharmacological and non-pharmacological treatment interventions especially in the preclinical stages, where prevention is still feasible.

8. REFERENCIAS

- Adamczuk, K., De Weer, A. S., Nelissen, N., Chen, K., Sleegers, K., Bettens, K., ... Vandenberghe, R. (2013). Polymorphism of brain derived neurotrophic factor influences β amyloid load in cognitively intact apolipoprotein E ϵ 4 carriers. *NeuroImage: Clinical*, 2, 512–520. <http://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.04.001>
- Ando, K., Brion, J. P., Stygelbout, V., Suain, V., Authalet, M., Dedeker, R., ... Duyckaerts, C. (2013). Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathologica*, 125(6), 861–878.
- Ariza, M., Pueyo, R., Matarín, M. M, Junqué, C., Mataró, M., Clemente, I., ... Sahuquillo, J. (2006). Influence of APOE polymorphism on cognitive and behavioural outcome in moderate and severe traumatic brain injury. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 77, 1191–1193.
- Baars, B., & Gage, N. (2013). *Fundamentals of cognitive neuroscience: a beginner's guide*. Oxford: Academic Press.
- Babiloni, C., Binetti, G., Cassetta, E., Cerboneschi, D., Dal Forno, G., Del Percio, C., ... Rossini, P. (2004). Mapping distributed sources of cortical rhythms in mild Alzheimer's disease. A multicentric EEG study. *NeuroImage*, 22(1), 57–67.
- Babiloni, C., Lizio, R., Marzano, N., Capotosto, P., Soricelli, A., Ivano, A., ... Del, C. (2016). Brain neural synchronization and functional coupling in Alzheimer's disease as revealed by resting state EEG rhythms. *International Journal of Psychophysiology*, 103, 88–102. <http://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2015.02.008>
- Bai, F., Shu, N., Yuan, Y., Shi, Y., Yu, H., Wu, D., ... Zhang, Z. (2012). Topologically convergent and divergent structural connectivity patterns between patients with remitted geriatric depression and amnesic mild cognitive impairment. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(12), 4307–4318. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5061-11.2012>
- Baillet, S., Mosher, J., & Leahy, R. (2001). Electromagnetic brain mapping. *IEEE Signal Processing Magazine*, 18(6), 14–30.

- Ball, K., Berch, D. B., Helmers, K. F., Jobe, J. B., Leveck, M. D., Marsiske, M., ... Willis, S. L. (2002). Effects of Cognitive Training Interventions With Older Adults: A Randomized Controlled Trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 288(18), 2271–2281.
- Ballesteros Jiménez, S. (2016). Concepto de Envejecimiento Cognitivo y Cerebral. En S. Ballesteros Jiménez, *Factores protectores del envejecimiento cognitivo* (pp. 19–53). Madrid: Editorial UNED, Ciencias de la Salud.
- Barnes, L. L., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Schneider, J. A., Evans, D. A., & Bennett, D. A. (2005). Sex Differences in the Clinical Manifestations of Alzheimer Disease Pathology. *Archives of General Psychiatry*, 62(6), 685–681. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.685>
- Başar, E. (2013). A review of gamma oscillations in healthy subjects and in cognitive impairment, 90, 99–117. <http://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2013.07.005>
- Başar, E., Durusu, D., Güntekin, B., & Yener, G. G. (2016). NeuroImage: Clinical Delay of cognitive gamma responses in Alzheimer's disease, 11, 106–115. <http://doi.org/10.1016/j.nicl.2016.01.015>
- Başar, E., & Düzgün, A. (2016). How is the brain working ? Research on brain oscillations and connectivities in a new “Take-Off” state, 103, 3–11. <http://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2015.02.007>
- Başar, E., Tülay, E., & Güntekin, B. (2015). Multiple gamma oscillations in the brain: A new strategy to differentiate functional correlates and P300 dynamics. *International Journal of Psychophysiology*, 95(3), 406–420. <http://doi.org/10.1016/J.IJPSYCHO.2015.01.013>
- Bath, K. G., & Lee, F. S. (2006). Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 6(1), 79–85. <http://doi.org/10.3758/CABN.6.1.79>
- Benitez, B., Cruchaga, C., & United States–Spain Parkinson's Disease Research Group. (2013). TREM2 and neurodegenerative disease. *The New England journal of medicine*, 369(16), 1567–1568.

- Bennett, D., Yu, L., Yang, J., Klein, H. U., & De Jager, P. (2017). Epigenomics of Alzheimer's Disease. *Translating Epigenetics to the Clinic*, 227–278.
- Benton, A., & Hamsher, K. (1989). *Multilingual Aphasia Examination*. (T. U. of I. Department of Neurology and Psychology, Ed.) (2nd ed.). Iowa City.
- Berger, H. (1929). Ueber das Elektroenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 87(1), 527–570. doi:10.1007/BF01797193.
- Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D., & Tanzi, R. E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the Alzgene database. *Nature genetics*, 39(19), 17–23.
- Beste, C., Kolev, V., Yordanova, J., Domschke, K., Falkenstein, M., Baune, B. T., & Konrad, C. (2010). The Role of the BDNF Val66Met Polymorphism for the Synchronization of Error-Specific Neural Networks, 30(32), 10727–10733. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2493-10.2010>
- Bettens, K., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 12(1), 92–104.
- Betz, R., Byrge, L., He, Y., Goñi, J., Zuo, X. N., & Sporns, O. (2014). Changes in structural and functional connectivity among resting-state networks across the human lifespan. *NeuroImage*, 102, 345–357.
- Biffi, A., Anderson, C., Desikan, R., Sabuncu, M., Cortellini, L., Schmansky, N., ... Rosand, J. (2010). Genetic Variation and Neuroimaging Measures in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 67(6), 677–685.
- Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 22(3), 123–131.
- Bondi, M. W., Salmon, D. P., Monsch, A. U., Galasko, D., Butters, N., Klauber, M. R., ... Saitoh, T. (1995). Episodic memory changes are associated with the APOE-epsilon 4 allele in nondemented older adults. *Neurology*, 45, 2203–2206.

- Borrás Blasco, C., & Viña Ribes, J. (2016). Neurofisiología y envejecimiento. Conceptos y bases fisiopatológicas del deterioro cognitivo. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 51(Supl 1), 3–6.
- Boulle, F., van den Hove, D. L. A., Jakob, S. B., Rutten, B. P., Hamon, M., van Os, J., ... Kenis, G. (2012). Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 17(6), 584–596. <http://doi.org/10.1038/mp.2011.107>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239–259.
- Braak, H., & Braak, E. (1996). Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 165, 3–12.
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2011). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta neuropathologica*, 121, 171–181.
- Bralten, J., Franke, B., Arias-Vásquez, A., Heister, A., Brunner, H., Fernández, G., & Rijpkema, M. (2011). CR1 genotype is associated with entorhinal cortex volume in young healthy adults. *Neurobiology of Aging*, 32(11), 2106.e7-2106.e11.
- Braskie, M., Jahanshad, N., Stein, J., Barysheva, M., McMahon, K., de Zubicaray, G., ... Thompson, P. (2011a). Common Alzheimer's Disease Risk Variant Within the CLU Gene Affects White Matter Microstructure in Young Adults. *Journal of Neuroscience*, 31(18), 6764–6770.
- Braskie, M., Ringman, J., & Thompson, P. (2011). Neuroimaging measures as endophenotypes in Alzheimer's disease. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, 490140.
- Bretsky, P., Guralnik, J. M., Launer, L., Albert, M., Seeman, T. E. (2003). The role of APOE-epsilon4 in longitudinal cognitive decline: MacArthur Studies of Successful Aging. *Neurology*, 60, 1077–1081.
- Brooks, S. J., Nilsson, E. K., Jacobsson, J. a., Stein, D. J., Fredriksson, R., Lind, L., & Schiöth, H. B. (2014). BDNF polymorphisms are linked to poorer working memory performance, reduced cerebellar and hippocampal volumes and differences in prefrontal

- cortex in a Swedish elderly population. *PLoS ONE*, 9(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082707>
- Brown, J., Richardson, J., Collingridge, G., Randall, A., & Davies, C. (2005). Synaptic transmission and synchronous activity is disrupted in hippocampal slices taken from aged TAS10 mice. *Hippocampus*, 15(1), 110–117.
- Bu, G. (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 10, 333–344.
- Buckner, R., & Vincent, J. (2007). Unrest at rest: Default activity and spontaneous network correlations. *NeuroImage*, 37(4), 1091–1096.
- Buchhave, P., Zetterberg, H., Blennow, K., Minthon, L., Janciauskiene, S., & Hansson, O. (2010). Soluble TNF receptors are associated with A β metabolism and conversion to dementia in subjects with mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 31(11), 1877–1884.
- Buldú, J., & Porter, M. (2017). Frequency-based brain networks: From a multiplex framework to a full multilayer description. *Network Neuroscience*, 362–385.
- Bunce, D., Anstey, K. J., Burns, R., Christensen, H. y Easteal, S. (2011). Does possession of apolipoprotein E ϵ 4 benefit cognitive function in healthy young adults? *Neuropsychologia*, 49, 1693–1697.
- Buschkuehl, M. & Jaeggi, S. M. (2010). Improving intelligence: A literature review. *Swiss Medical Weekly*, 140, 266–272.
- Buzsáki, G. (2006). *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:oso/9780195301069.001.0001.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6), 407–420.
- Buzsáki, G., & Wang, X. J. (2012). Mechanisms of Gamma Oscillations. *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), 203–225. <http://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150444>

- Cagnin, A., Brooks, D., Kennedy, A., Gunn, R., Myers, R., Turkheimer, F., ... Banati, R. (2001). In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *The Lancet*, 358(9280), 461–467.
- Cai, D., & El Gaamouch, F. (2016). Risk Factors for Alzheimer's Disease. En D. Cai, & F. El Gaamouch, *Update on Dementia*. InTech.
- Capilla, A. & Carretié, L. (2015). Bases neurofisiológicas de las oscilaciones cerebrales. En F. Maestú (Ed.), *Conectividad Funcional y Anatómica en el Cerebro Humano* (pp. 29–37). Madrid: Elsevier.
- Canuet, L., Pusil, S., López, M. E., Bajo, R., Pineda-Pardo, J. A., Cuesta, P., ... Maestú, F. (2015). Network disruption and cerebrospinal fluid amyloid-beta and phospho-tau levels in mild cognitive impairment. *Journal of neuroscience*, 35, 10325–10330.
- Carrasquillo, M., Crook, J., Pedraza, O., Thomas, C., Pankratz, V., Allen, M., ... Ertekin-Taner, N. (2015). Late-onset Alzheimer's risk variants in memory decline, incident mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 36(1), 60–67.
- Carretié, L. (2011). *Anatomía de la mente: Emoción, cognición y cerebro*. Madrid: Pirámide.
- Caselli, R.J., Dueck, A. C., Osborne, D., Sabbagh, M. N., Connor, D. J., Ahern, G. L., ... Reiman, E. M. (2009). Longitudinal modeling of age-related memory decline and the APOE ε4 effect. *The New England Journal of Medicine*, 361, 255–263.
- Cavanagh, J., & Frank, M. (2014). Frontal theta as a mechanism for cognitive control. *Trends in Cognitive Sciences*, 18(8), 414–421.
- Chafetz, M. & Matthews, L. (2004). A new interference score for the Stroop test. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 19, 555–567
- Chanock, S. (2001). Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Disease markers*, 17(2), 89–98.
- Chao, M. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 299–309.

- Chartier-Harlin, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., ... Mullan, M. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature*, 353(6347), 844–846.
- Chartier-Harlin, M. C., Parfitt, M., Legrain, S., Pérez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., ... Gourlet, V. (1994) Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: Analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Human molecular genetics*, 3, 569–574.
- Chauhan, G., Adams, H., Bis, J., Weinstein, G., Yu, L., Töglhofer, A., ... Debette, S. (2015). Association of Alzheimer's disease GWAS loci with MRI markers of brain aging. *Neurobiology of Aging*, 36(4), 1765.e7-1765.e16.
- Chen, Z. Y., Jing, D., Bath, K. G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C.-J., ... Lee, F. S. (2006). Genetic Variant BDNF (Val66Met) Polymorphism Alters Anxiety-Related Behavior. *Science*, 314(5796), 140–143. <http://doi.org/10.1126/science.1129663>
- Chen, Z. Y., Patel, P. D., Sant, G., Meng, C. X., Teng, K. K., Hempstead, B. L., & Lee, F. S. (2004). Variant Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Met66) Alters the Intracellular Trafficking and Activity-Dependent Secretion of Wild-Type BDNF in Neurosecretory Cells and Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4401–4411. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0348-04.2004>
- Chen, A., Xiong, L. J., Tong, Y., & Mao, M. (2013). The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomedical Reports*, 1(2), 167–176. <http://doi.org/10.3892/br.2012.48>
- Chibnik, L., Shulman, J., Leurgans, S., Schneider, J., Wilson, R., Tran, D., ... De Jager, P. (2011). CR1 is associated with amyloid plaque burden and age-related cognitive decline. *Annals of Neurology*, 69(3), 560–569.
- Chiesa, P. A., Cavedo, E., Lista, S., Thompson, P. M., Hampel, H., & If, T. D. (2017). Revolution of Resting-State Functional Neuroimaging Genetics in Alzheimer's Disease. *Trends in Neurosciences*, 40(8), 469–480. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2017.06.002>
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R., & Wilfinger, W. (1997). DNazol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*, 22(3), 550–553.

- Clemens, B. (2004). Pathological theta oscillations in idiopathic generalised epilepsy. *Clinical Neurophysiology*, 115(6), 1436–1441.
- Cohen-Cory, S., & Fraser, S. E. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature*, 378(6553), 192–196. <http://doi.org/10.1038/378192a0>
- Cook, I., & Leuchter, A. (1996). Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: clinical assessment using quantitative EEG. *Behavioural Brain Research*, 78(1), 15–23.
- Corder, E., Saunders, A., Risch, N., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., ... Pericak-Vance, M. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics*, 7(2), 180–184.
- Corder, E., Saunders, A., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., Small, G., ... Pericak-Vance, M. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), 921–923.
- Correas-Marín, M. A. (2017). *Brain Magnetic Activity Profiles of Young Binge Drinkers* (PhD Thesis). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Criscuolo, C., Fabiani, C., Bonadonna, C., Origlia, N., & Domenici, L. (2015). BDNF prevents amyloid-dependent impairment of LTP in the entorhinal cortex by attenuating p38 MAPK phosphorylation. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1303–1309. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.016>
- Cruchaga, C., Del-Aguila, J., Saef, B., Black, K., Fernandez, M., Budde, J., . . . Harari, O. (2018). Polygenic risk score of sporadic late-onset Alzheimer's disease reveals a shared architecture with the familial and early-onset forms. *Alzheimer's & Dementia*, 14(2), 205–214.
- Cuesta, P., Garcés, P., Castellanos, N., López, M., Aurtenetxe, S., Bajo, R., . . . Maestú, F. (2015). Influence of the APOE ϵ 4 Allele and Mild Cognitive Impairment Diagnosis in the Disruption of the MEG Resting State Functional Connectivity in Sources Space. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(2), 493–505.

- Darst, B., Kosciak, R., Racine, A., Oh, J., Krause, R., Carlsson, C., ... Engelman, C. (2017). Pathway-Specific Polygenic Risk Scores as Predictors of Amyloid- β Deposition and Cognitive Function in a Sample at Increased Risk for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(2), 473–484.
- Darvas, F., Pantazis, D., Kucukaltun-Yildirim, E., & Leahy, R. (2004). Mapping human brain function with MEG and EEG: methods and validation. *NeuroImage*, 23, S289–S299.
- Das, D., Tan, X., Bielak, A. A. M., Cherbuin, N., Easta, S. & Anstey, K. J. (2014). Cognitive ability, intraindividual variability, and common genetic variants of catechol-O-methyltransferase and brain-derived neurotrophic factor: A longitudinal study in a population-based sample of older adults. *Psychology and Aging*, 29, 393–403.
- De Jonge, P. & de Jong, P. F. (1996). Working memory, intelligence and reading ability in children. *Personality and Individual Differences*, 21, 1007–1020.
- Delbeuck, X., Linden, M., & Collette, F. (2003). Alzheimer' Disease as a Disconnection Syndrome? *Neuropsychology Review*, 13(2), 79–92.
- Demirtaş, M., Falcon, C., Tucholka, A., Gispert, J., Molinuevo, J., & Deco, G. (2017). A whole-brain computational modeling approach to explain the alterations in resting-state functional connectivity during progression of Alzheimer's disease. *NeuroImage: Clinical*, 16, 343–354.
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M., Deogracias, R., ... Barde, Y. A. (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *The Journal of Cell Biology*, 196(6), 775–788.
- Dima, D., & Breen, G. (2015). Polygenic risk scores in imaging genetics: Usefulness and applications. *Journal of Psychopharmacology*, 29(8), 867–871.
- Dimitriadis, S., López, M., Bruña, R., Cuesta, P., Marcos, A., Maestú, F., & Pereda, E. (2018). How to build a functional connectomic biomarker for mild cognitive impairment from source reconstructed MEG Resting-state activity: The combination of ROI representation and connectivity estimator matters. *Frontiers in Neuroscience*, 12(JUN). <http://doi.org/10.3389/fnins.2018.00306>

- Dincheva, I., Glatt, C. E., & Lee, F. S. (2012). Impact of the BDNF Val66Met Polymorphism on Cognition. *The Neuroscientist*, 18(5), 439–451. <http://doi.org/10.1177/1073858411431646>
- Doraiswamy, P., Sperling, R., Johnson, K., Reiman, E., Wong, T., Sabbagh, M., ... Sadowsky, C. (2014). Florbetapir F 18 amyloid PET and 36-month cognitive decline: a prospective multicenter study. *Molecular Psychiatry*, 19(9), 1044–1051.
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., ... Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on “The Preclinical State of AD”; July 23, 2015; Washington DC, USA. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's & Dementia*, 12(3), 292–323.
- Dudbridge, F. (2013). Power and Predictive Accuracy of Polygenic Risk Scores. (N. Wray, Ed.) *PLoS Genetics*, 9(3), e1003348.
- Ebbert, M., Ridge, P., Wilson, A., Sharp, A., Bailey, M., Norton, M., ... Kauwe, J. (2014). Population-based analysis of Alzheimer's disease risk alleles implicates genetic interactions. *Biological Psychiatry*, 75(9), 732–737.
- Edison, P., Archer, H., Gerhard, A., Hinz, R., Pavese, N., Turkheimer, F., ... Brooks, D. (2008). Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiology of Disease*, 32(3), 412–419.
- Edwardas, J. D., Xu, H., Clark, D., Ross, L. A. & Unverzagt, F. W. (2016). The ACTIVE study: What we have learned and what is next? Cognitive training reduces incident dementia across ten years. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 12, 212.
- Egan, M. F., Kojima, M., Callicott, J. H., Goldberg, T. E., Kolachana, B. S., Bertolino, A., ... Weinberger, D. R. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, 112(2), 257–269.

- Elias-Sonnenschein, L., Bertram, L., & Visser, P. (2012). Relationship between genetic risk factors and markers for Alzheimer's disease pathology. *Biomarkers in Medicine*, 6(4), 477–495.
- Engel, A., & Fries, P. (2010). Beta-band oscillations — signalling the status quo? *Current Opinion in Neurobiology*, 20(2), 156–165.
- Engelhart, M., Geerlings, M., Meijer, J., Kiliaan, A., Ruitenberg, A., van Swieten, J., ... Breteler, M. (2004). Inflammatory Proteins in Plasma and the Risk of Dementia. *Archives of Neurology*, 61(5), 668–672.
- Engels, M., van der Flier, W., Stam, C., Hillebrand, A., Scheltens, P., & van Straaten, E. (2017). Alzheimer's disease: The state of the art in resting-state magnetoencephalography. *Clinical Neurophysiology*, 128(8), 1426–1437.
- Erickson, K. I., Miller, D. L., & Roecklein, K. A. (2012). The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. *The Neuroscientist*, 18(1), 82–97. <http://doi.org/10.1177/1073858410397054>
- Erk, S., Meyer-Lindenberg, A., Opitz von Boberfeld, C., Esslinger, C., Schnell, K., Kirsch, P., ... Walter, H. (2011). Hippocampal Function in Healthy Carriers of the CLU Alzheimer's Disease Risk Variant. *Journal of Neuroscience*, 31(49), 18180–18184.
- Escott-Price, V., Shoai, M., Pither, R., Williams, J., & Hardy, J. (2017). Polygenic score prediction captures nearly all common genetic risk for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 49, 214.e7-214.e11.
- Escott-Price, V., Sims, R., Bannister, C., Harold, D., Vronskaya, M., Majounie, E., ... Williams, J. (2015). Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain*, 138(12), 3673–3684.
- Fell, J., & Axmacher, N. (2011). The role of phase synchronization in memory processes. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 105–118.
- Feng, W., Yokoyama, J. S., Yu, S., Chen, Y., Cheng, Y., Bonham, L. W., ... Li, C. (2015). APOE genotype affects cognitive training response in healthy Shanghai community-dwelling elderly individuals. *Journal of Alzheimer's Disease*, 47, 1035–1046.

- Ferencz, B., Laukka, E., Welmer, A.-K., Kalpouzos, G., Angleman, S., Keller, L., ... Bäckman, L. (2014). The Benefits of Staying Active in Old Age: Physical Activity Counteracts the Negative Influence of PICALM, BIN1, and CLU Risk Alleles on Episodic Memory Functioning. *Psychology and Aging*, 29(2), 440–449.
- Fernández, T., Harmony, T., Rodríguez, M., Bernal, J., Silva, J., Reyes, A., & Marosi, E. (1995). EEG activation patterns during the performance of tasks involving different components of mental calculation. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 94(3), 175–182.
- Fernández-Bouzas, A., Harmony, T., Bosch, J., Aubert, E., Fernández, T., Valdés, P., ... Casián, G. (1999). Sources of Abnormal EEG Activity in the Presence of Brain Lesions. *Clinical Electroencephalography*, 30(2), 46–52.
- Ferrari, R., Moreno, J., Minhajuddin, A., O'Bryant, S., Reisch, J., Barber, R., & Momeni, P. (2012). Implication of common and disease specific variants in CLU, CR1, and PICALM. *Neurobiology of Aging*, 33(8), 1846.e7-18.
- Ferri, C., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., ... Alzheimer's Disease International. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 366(9503), 2112–2117.
- Filippini, N., Ebmeier, K. P., MacIntosh, B. J., Trachtenberg, A. J., Frisoni, G. B., Wilcock, G. K., ... Mackay, C. E. (2011). Differential effects of the APOE genotype on brain function across the lifespan. *Neuroimage*, 54, 602–610.
- Filippini, N., MacIntosh, B. J., Hough, M. G., Goodwin, G. M., Frisoni, G. B., Smith, S. M., ... Mackay C. E. (2009). Distinct patterns of brain activity in young carriers of the APOE-epsilon4 allele. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 7209–7214.
- Fischl, B., Salat, D. H., Busa, E., Albert, M., Dieterich, M., Haselgrove, C., ... Dale, A. M. (2002). Whole brain segmentation: Automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron*, 33, 341–355.

- Fisher, D. W., Bennett, D. A., & Dong, H. (2018). Sexual dimorphism in predisposition to Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 70, 308–324. <http://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2018.04.004>
- Fleisher, A., Grundman, M., Jack, C. R., Petersen, R. C., Taylor, C., Kim, H. T., ... Alzheimer's Disease Cooperative Study. (2005). Sex, Apolipoprotein E ϵ 4 Status, and Hippocampal Volume in Mild Cognitive Impairment. *Archives of Neurology*, 62(6), 953–957. <http://doi.org/10.1001/archneur.62.6.953>
- Foley, S., Tansey, K., Caseras, X., Lancaster, T., Bracht, T., Parker, G., ... Linden, D. (2018). Multimodal Brain Imaging Reveals Structural Differences in Alzheimer's Disease Polygenic Risk Carriers: A Study in Healthy Young Adults. *Biological Psychiatry*, 81(2), 154–161.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E. & McHugh, P. R. (1975). “Mini-mental state”: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, 12, 189–198.
- Forde, N. J., Ronan, L., Suckling, J., Scanlon, C., Neary, S., Holleran, L., ... Cannon, D. M. (2014). Structural neuroimaging correlates of allelic variation of the BDNF val66met polymorphism. *NeuroImage*, 90, 280–289. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.12.050>
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016). *Fundamentals of Brain Network Analysis*. London: Elsevier.
- Fries, P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends in Cognitive Sciences*, 9(10), 474–480.
- Fries, P. (2009). Neuronal Gamma-Band Synchronization as a Fundamental Process in Cortical Computation. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 209–224. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135603>
- Friston, K. (1994). Functional and effective connectivity in neuroimaging: A synthesis. *Human Brain Mapping*, 2(1-2), 56–78.
- Friston, K. (2001). Book Review: Brain Function, Nonlinear Coupling, and Neuronal Transients. *The Neuroscientist*, 7(5), 406–418.

- Furney, S., Simmons, A., Breen, G., Pedroso, I., Lunnon, K., Proitsi, P., ... AddNeuroMed Consortium. (2011). Genome-wide association with MRI atrophy measures as a quantitative trait locus for Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 16(11), 1130–1138.
- Gámiz, F. & Gallo, M. (2011). Taste learning and memory: A window on the study of brain aging. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 91–97.
- Garcés, P., Martín-Buro, M., & Maestú, F. (2016). Quantifying the Test-Retest Reliability of Magnetoencephalography Resting-State Functional Connectivity. *Brain Connectivity*, 6(6), 448–460.
- Garcia-Ptacek, S., Eriksdotter, M., Jelic, V., Porta-Etessam, J., Kåreholt, I., & Manzano Palomo, S. (2016). Quejas cognitivas subjetivas: hacia una identificación precoz de la enfermedad de Alzheimer [Subjective cognitive impairment: Towards early identification of Alzheimer disease]. *Revista de neurología*, 31(8), 562–571.
- Gatz, M., Reynolds, C., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J., Berg, S., ... Pedersen, N. (2006). Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. *Archives of General Psychiatry*, 63(2), 168–174.
- Ge, T., Sabuncu, M., Smoller, J., Sperling, R., & Mormino, E. (2018). Dissociable influences of APOE ϵ 4 and polygenic risk of AD dementia on amyloid and cognition. *Neurology*, 90(18), e1605-e1612.
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F., Bussière, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D., ... Hof, P. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60(9), 1495–1500.
- Giau, V. V., Bagyinszky, E., An, S. S. & Kim, S. Y. (2015). Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11, 1723–1737.
- Gispert, J. D., Rami, L., Sánchez-Benavides, G., Falcon, C., Tucholka, A., Rojas, S., ... Molinuevo, J. L. (2015). Nonlinear cerebral atrophy patterns across the Alzheimer's disease continuum: Impact of APOE4 genotype. *Neurobiology of Aging*, 36, 2687–2701.

- Giuli, C., Papa, R., Lattanzio, F. & Postacchini, D. (2016). The effects of cognitive training for elderly: Results from My Mind Project. *Rejuvenation research*, 19(6), 485–494.
- Giuli C., Fattoretti P., Gagliardi C., Mocchegiani E., Venarucci D., Balietti M., ... Postacchini, D. (2017). My Mind Project: The effects of cognitive training for elderly- the study protocol of a prospective randomized intervention study. *Aging clinical and experimental research*, 29(3), 353–360.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., ... Hardy, J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704–706.
- Golden, C. J. (1978). The Stroop Color and Word Test: A manual for clinical and experimental uses. *IL: Stoelting, Chicago*.
- Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J., Petersen, R., ... Hyman, B. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 41(1), 17–24.
- Gómez-Isla, T., Spires, T., De Calignon, A., & Hyman, B. (2008). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 89, 233–243.
- Gueorguieva, R. & Krystal, J. H. (2004). Move over ANOVA: Progress in analyzing repeated-measures data and its reflection in papers published in the Archives of General Psychiatry. *Archives of general psychiatry*, 61, 310–317.
- Guerreiro, R., Brás, J., & Hardy, J. (2013a). Snapshot: genetics of Alzheimer's disease. *Cell*, 155(4), 968–968.
- Guerreiro, R., Wotjas, A., Brás, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., ... Alzheimer Genetics Analysis Group. (2013b). TREM variants in Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 368(2), 117–127.
- Green, A., Gray, J., DeYoung, C., Mhyre, T., Padilla, R., DiBattista, A., & William Rebeck, G. (2014). A combined effect of two Alzheimer's risk genes on medial temporal activity during executive attention in young adults. *Neuropsychologia*, 56, 1–8.

- Greicius, M. (2008). Resting-state functional connectivity in neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurology*, 24(4), 424–430.
- Greicius, M., Krasnow, B., Reiss, A., & Menon, V. (2003). Functional connectivity in the resting brain: A network analysis of the default mode hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), 253–258.
- Gruber, O., Hasan, A., Scherk, H., Wobrock, T., Schneider-Axmann, T., Ekawardhani, S., ... Falkai, P. (2012). Association of the brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism with magnetic resonance spectroscopic markers in the human hippocampus: In vivo evidence for effects on the glutamate system. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 262, 23–31. <http://doi.org/10.1007/s00406-011-0214-6>
- Han, Z., Huang, H., Gao, Y., & Huang, Q. (2017). Functional annotation of Alzheimer's disease associated loci revealed by GWASs. (S. Ginsberg, Ed.) *PLoS One*, 12(6), e0179677.
- Haan, M. N. & Mayeda, E. R. (2010). Apolipoprotein E genotype and cardiovascular diseases in the elderly. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 4, 361–368.
- Hanlon, C. S. & Rubinsztein, D. C. (1995). Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis*, 112, 85–90.
- Harada, C., Natelson Love, M., & Triebel, K. (2013). Normal Cognitive Aging. *Clinics in Geriatric Medicine*, 29(4), 737–752.
- Hardy, J., & Higgins, G. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054), 184–185.
- Harmony, T. (2013). The functional significance of delta oscillations in cognitive processing. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 83.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M., ... Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10), 1088–1093.

- Harrison, T., & Bookheimer, S. (2016). Neuroimaging Genetic Risk for Alzheimer's Disease in Preclinical Individuals: From Candidate Genes to Polygenic Approaches. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 1(1), 14–23.
- Harrison, T., Mahmood, Z., Lau, E., Karacozoff, A., Burggren, A., Small, G., & Bookheimer, S. (2016). An Alzheimers Disease Genetic Risk Score Predicts Longitudinal Thinning of Hippocampal Complex Subregions in Healthy Older Adults. *eNeuro*, 3(3), pii: ENEURO.0098-16.2016.
- Hart, B., Cribben, I., & Fiecas, M. (2018). A longitudinal model for functional connectivity networks using resting-state fMRI. *NeuroImage*, 178, 687–701.
- Hashimoto, R., Hirata, Y., Asada, T., Yamashita, F., Nemoto, K., Mori, T., ... Ohnishi, T. (2009). Effect of the brain-derived neurotrophic factor and the apolipoprotein E polymorphisms on disease progression in preclinical Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior*, 8, 43–52. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00440.x>
- Hasselmo, M., & Eichenbaum, H. (2005). Hippocampal mechanisms for the context-dependent retrieval of episodes. *Neural Networks*, 18(9), 1172–1190.
- Head, D., Bugg, J. M., Goate, A. M., Fagan, A. M., Mintun, M. A., Benzinger, T., ... Morris, J. C. (2012). Exercise engagement as a moderator of APOE effects on amyloid deposition. *Archives of Neurology*, 69(5), 636–643.
- Heneka, M., Carson, M., Khoury, J., Landreth, G., Brosseron, F., Feinstein, D., ... Kummer, M. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405.
- Hill, N. T., Mowszowski, L., Naismith, S. L., Chadwick, V. L., Valenzuela, M. & Lampit, A. (2016). Computerized cognitive training in older adults with mild cognitive impairment or dementia: A systematic review and meta-Analysis. *The American journal of psychiatry*, 14, 1–12.
- Hohman, T. J., Koran, M. E., Thornton-Wells, T; Alzheimer's Neuroimaging Initiative (2013). Epistatic genetic effects among Alzheimer's candidate genes. *PLoS one*, 8(11), e80839.

- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M., ... Williams, J. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 429–435.
- Holm, M. M., Nieto-gonzalez, J. L., Vardya, I., Vaegter, C. B., & Nykjaer, A. (2009). Mature BDNF, But Not proBDNF , Reduces Excitability of Fast-Spiking Interneurons in Mouse Dentate Gyrus, 29(40), 12412–12418. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2978-09.2009>
- Honea, R. A., Cruchaga, C., Perea, R. D., Saykin, A. J., Burns, J. M., Weinberger, D. R., & Goate, A. M. (2013). Characterizing the Role of Brain Derived Neurotrophic Factor Genetic Variation in Alzheimer's Disease Neurodegeneration. *PLoS One*, 8(9), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0076001>
- Honea, R. A., Vidoni, E., Harsha, A. & Burns, J. M. (2009). Impact of APOE on the healthy aging brain: A voxel-based MRI and DTI study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18, 553–564.
- Horch, H. W., Krüttgen, A., Portbury, S. D., & Katz, L. C. (1999). Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron*, 23(2), 353–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399940>
- Houlden, H., Crook, R., Backhovens, H., Prihar, G., Baker, M., Hutton, M., ... Hardy, J. (1998). ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset Alzheimer's disease families. *American Journal of Medical Genetics*, 81, 117–121
- Huang, C. C., Liu, M. E., Chou, K. H., Yang, A. C., Hung, C. C., Hong, C. J., ... Lin, C. P. (2014). Effect of BDNF Val66Met polymorphism on regional white matter hyperintensities and cognitive function in elderly males without dementia. *Psychoneuroendocrinology*, 39(201), 94–103. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.09.027>
- Huang, E., & Reichardt, L. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 677–736.
- Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S., & Mehlen, P. (2012). Neurotrophins and cell death. *Experimental Cell Research*, 318(11), 1221–1228.

- Imtiaz, B., Tolppanen, A.-M., Kivipelto, M., & Soininen, H. (2014). Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 661–670.
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K., Growdon, J., Hedley-Whyte, E., Frosch, M., ... Irizarry, M. (2004). Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, 62(6), 925–931.
- Institute for Health Metrics and Evaluation, IHME (2016). <http://www.healthdata.org/>
- Instituto Nacional de Estadística, INE (2016). <http://www.ine.es/prensa/np994.pdf>
- Izaks, G. J., Gansevoort, R. T., Van der Knaap, A. M., Navis, G., Dullaart, R. P. F., Slaets, J. P. J. (2011). The association of APOE genotype with cognitive function in persons aged 35 years or older. *PLoS One*, 6(11), e27415.
- Jack, C., Knopman, D., Jagust, W., Petersen, R., Weiner, M., Aisen, P., ... Trojanowski, J. (2013). Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet Neurology*, 12(2), 207–216.
- Jack, C., Knopman, D., Jagust, W., Shaw, L., Aisen, P., Weiner, M., ... Trojanowski, J. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*, 9(1), 119–128.
- Jack, C., Wiste, H., Weigand, S., Rocca, W., Knopman, D., Mielke, M., ... Petersen, R. (2014). Age-specific population frequencies of cerebral β -amyloidosis and neurodegeneration among people with normal cognitive function aged 50–89 years: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology*, 13(10), 997–1005.
- Jaeggi, S. M., Buschkuhl, M., Jonides, J. & Perrig, W. J. (2008). Improving fluid intelligence with training on working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), 6829–6833.
- Jagust, W. (2009). Genes and cognitive aging. *Frontiers in Neuroscience*, 3, 161–163.
- Jang, J. H., Yun, J. Y., Jung, W. H., Shim, G., Byun, M. S., Hwang, J. Y., ... Kwon, J. S. (2012). The impact of genetic variation in comt and bdnf on resting-state functional

- connectivity. *International Journal of Imaging Systems and Technology*, 22, 97–102.
<http://doi.org/10.1002/ima.22000>
- Jaušovec, N. & Jaušovec, K. (2012). Working memory training: Improving intelligence – Changing brain activity. *Brain and Cognition*, 79, 96–106.
- Jensen, O., Kaiser, J., & Lachaux, J. P. (2007). Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory. *Trends in Neurosciences*, 30(7), 317–324.
- Jessen, F., Amariglio, R. E., van Boxtel, M., Breteler, M., Ceccaldi, M., Chételat, G., ... Wagner, M. (2014). A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 10(6), 844–852.
<http://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.01.001>
- Ji, Y., Shi, Z., Liu, M., Liu, S., Liu, S. & Wang, J. (2014). Association between the COMT Val158Met genotype and Alzheimer's disease in the Han Chinese population, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 4, 14–21.
- Jochemsen, H. M., Muller, M., Van der Graaf, Y. & Geerlings, M. I. (2012). APOE ε4 differentially influences change in memory performance depending on age. The SMART-MR study. *Neurobiology of Aging*, 33(4), 832.e15-22.
- Jones, L., Holmans, P., Hamshere, M., Harold, D., Moskvina, V., Ivanov, D., ... Williams, J. (2010). Genetic Evidence Implicates the Immune System and Cholesterol Metabolism in the Aetiology of Alzheimer's Disease. (J. El Khoury, Ed.) *PLoS One*, 5(11), e13950.
- Jones, L., Lambert, J. C., Wang, L. S., Choi, S.-H., Harold, D., Vedernikov, A., ... Holmans, P. (2015). Convergent genetic and expression data implicate immunity in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 11(6), 658–671.
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P., Snaedal, J., ... Stefansson, K. (2013). Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 368(2), 107–116.
- Jun, G., Naj, A., Beecham, G., Wang, L. S., Buross, J., Gallins, P., ... Schellenberg, G. (2010). Meta-Analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer's disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Archives of Neurology*, 67(12), 1473–1484.

- Kambeitz, J. P., Bhattacharyya, S., Kambeitz-Ilankovic, L. M., Valli, I., Collier, D. A., & McGuire, P. (2012). Effect of BDNF val66met polymorphism on declarative memory and its neural substrate: A meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(9), 2165–2177. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.002>
- Kamboh, M. (2004). Molecular Genetics of Late-Onset Alzheimer's Disease. *Annals of Human Genetics*, 68(4), 381–404.
- Kang, H., & Schuman, E. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5204), 1658–1662.
- Kaplan, E., Goodglass, H., & Weintraub, S. (1983). *The Boston Naming Test*. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Karch, C., & Goate, A. (2015). Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77(1), 43–51.
- Kauppi, K., Nilsson, L. G., Persson, J., & Nyberg, L. (2014). Additive genetic effect of APOE and BDNF on hippocampus activity. *NeuroImage*, 89, 306–313. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.11.049>
- Kelly, M.E., Loughrey, D., Lawlor, B. A., Robertson, I. H., Walsh, C. & Brennan, S. (2014). The impact of cognitive training and mental stimulation on cognitive and everyday functioning of healthy older adults: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 15, 28–43.
- Kennedy, K. M., & Raz, N. (2009). Aging white matter and cognition: Differential effects of regional variations in diffusion properties on memory, executive functions, and speed. *Neuropsychologia*, 47(3), 916–927. <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.01.001>
- Kennedy, K. M., Reese, E. D., Horn, M. M., Sizemore, A. N., Unni, A. K., Meerbrey, M. E., ... Rodrigue, K. M. (2014). BDNF val66met polymorphism affects aging of multiple types of memory. *Brain Research*, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.044>
- Kim, J., Basak, J. M. & Holtzman, D. M. (2009). The role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 63, 287–303.

- Klimesch, W., Sauseng, P., & Hanslmayr, S. (2007). EEG alpha oscillations: The inhibition–timing hypothesis. *Brain Research Reviews*, 53(1), 63–88.
- Kloppel, S., Stonnington, C., Chu, C., Draganski, B., Scahill, R., Rohrer, J., ... Frackowiak, R. (2008). Automatic classification of MR scans in Alzheimer's disease. *Brain*, 131(3), 681–689.
- Kohannim, O., Hua, X., Rajagopalan, P., Hibar, D., Jahanshad, N., Grill, J., ... Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2013). Multilocus genetic profiling to empower drug trials and predict brain atrophy. *NeuroImage: Clinical*, 2, 827–835.
- Lacour, A., Espinosa, A., Louwersheimer, E., Heilmann, S., Hernández, I., Wolfsgruber, S., ... Ruiz, A. (2017). Genome-wide significant risk factors for Alzheimer's disease: Role in progression to dementia due to Alzheimer's disease among subjects with mild cognitive impairment. *Molecular Psychiatry*, 22(1), 153–160.
- Lachaux, J. P., Rodriguez, E., Martinerie, J., & Varela, F. (1999). Measuring phase synchrony in brain signals. *Human Brain Mapping*, 8(4), 194–208.
- Lambert, J., Ibrahim-Verbaas, C., Harold, D., Naj, A., Sims, R., Bellenguez, C., ... Seshadri, S. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 45(12), 1452–1458.
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., ... Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10), 1094–1099.
- Lampit, A., Hallock, H., & Valenzuela, M. (2014). Computerized cognitive training in cognitively healthy older adults: A systematic review and meta-analysis of effect modifiers. *PLoS medicine*, 11(11), e1001756.
- Lanni, C., Garbin, G., Lisa, A., Biundo, F., Ranzenigo, A., Sinforiani, E., ... Racchi, M. (2012). Influence of COMT Val158Met polymorphism on Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in Italian patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 32, 919–926.
- Laskowitz, D. T. & Vitek, M. P. (2007). Apolipoprotein E and neurological disease: Therapeutic potential and pharmacogenomic interactions. *Pharmacogenomics*, 8, 959–969.

- Laukka, E. J., Lövdén, M., Herlitz, A., Karlsson, S., Ferencz, B., Pantzar, A., ... Bäckman, L. (2013). Genetic effects on old-age cognitive functioning: A population-based study. *Psychology and Aging*, 28, 262–274.
- Law, G., Korth, M., Benecke, A., & Katze, M. (2013). Systems virology: host-directed approaches to viral pathogenesis and drug targeting. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 455–466.
- Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The Journal of experimental zoology*, 116(2), 321–361.
- Li, S. C., Chicherio, C., Nyberg, L., von Oertzen, T., Nagel, I. E., Papenberg, G., ... Bäckman, L. (2010). Ebbinghaus Revisited: Influences of the BDNF Val66Met Polymorphism on Backward Serial Recall Are Modulated by Human Aging. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 22(10), 2164–2173. <http://doi.org/10.1162/jocn.2009.21374>
- Li, Y., Wang, X., Li, Y., Sun, Y., Sheng, C., Li, H., ... Han, Y. (2016). Abnormal Resting-State Functional Connectivity Strength in Mild Cognitive Impairment and Its Conversion to Alzheimer's Disease. *Neural Plasticity*, 2016, 1–12.
- Lim, Y. Y., Villemagne, V. L., Laws, S. M., Ames, D., Pietrzak, R. H., Ellis, K. A., ... Maruff, P. (2013). BDNF Val66Met, A β amyloid, and cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34(11), 2457–2464. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.006>
- Lim, Y. Y., Villemagne, V. L., Laws, S. M., Ames, D., Pietrzak, R. H., Ellis, K. A., ... Maruff, P. (2014a). Effect of BDNF Val66Met on memory decline and hippocampal atrophy in prodromal alzheimer's disease: A preliminary study. *PLoS One*, 9(1), 10–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0086498>
- Lim, Y. Y., Villemagne, V. L., Laws, S. M., Pietrzak, R. H., Snyder, P. J., Ames, D., ... Maruff, P. (2014b). APOE and BDNF polymorphisms moderate amyloid β -related cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, (August), 1–7. <http://doi.org/10.1038/mp.2014.123>

- Lin, Y., Cheng, S., Xie, Z., & Zhang, D. (2014). Association of rs6265 and rs2030324 polymorphisms in brain-derived neurotrophic factor gene with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *PloS One*, 9(4), e94961. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094961>
- Liu, A., Dale, A., & Belliveau, J. (2002). Monte Carlo simulation studies of EEG and MEG localization accuracy. *Human Brain Mapping*, 16(1), 47–62.
- Liu, C. C., Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 9(2), 106–118.
- Lobo, A., Ezquerro, J., Gómez Burgada, F., Sala, J. M., & Seva Díaz, A. (1979). [Cognitive mini-test (a simple practical test to detect intellectual changes in medical patients)]. *Actas Luso-Españolas de Neurología, Psiquiatría Y Ciencias Afines*, 7(3), 189–202.
- Lobo, A., Saz, P. & Marcos, G. (2002). *MMSE examen cognoscitivo mini-mental* [MMSE mini-mental cognitive test], TEA, Madrid.
- Logan, J. M., Sanders, A. L., Snyder, A. Z., Morris, J. C. & Buckner, R. L. (2002). Under-Recruitment and Nonselective Recruitment. *Neuron*, 33(5), 827–840.
- Lopes da Silva, F. (2013). EEG and MEG: Relevance to Neuroscience. *Neuron*, 80(5), 1112–1128.
- López, M. E., Bruña, R., Aureneth, S., Pineda-Pardo, J. A., Marcos, A., Arrazola, J., ... Maestu, F. (2014). Alpha-Band Hypersynchronization in Progressive Mild Cognitive Impairment: A Magnetoencephalography Study. *Journal of Neuroscience*, 34(44), 14551–14559. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0964-14.2014>
- López, M. E., Engels, M. M. A., van Straaten, E. C. W., Bajo R., Delgado, M. L., Scheltens P., ... Maestú, F. (2017a). MEG beamformer-based reconstructions of functional networks in mild cognitive impairment. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 107.
- López-Higes, R., Rubio, S., Martín-Aragoneses, M.T., Del Río, D. y Mejuto, G. (2012). Evaluación de la comprensión gramatical en el envejecimiento normal y patológico: Un resumen de los resultados obtenidos con las baterías ECCO y ECCO-Senior [Assessment of grammar comprehension in normal and pathological aging: An

- overview of the results obtained with ECCO and ECCO-Senior batteries]. *International Journal of Psychological Research*, 5, 96–108.
- López-Sanz, D., Bruña, R., Garcés, P., Martín-Buro, M. C., Walter, S., Delgado, M. L., ... Maestú, F. (2017b). Functional connectivity disruption in subjective cognitive decline and mild cognitive impairment: a common pattern of alterations. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 109.
- Louwersheimer, E., Wolfsgruber, S., Espinosa, A., Lacour, A., Heilmann-Heimbach, S., Alegret, M., ... Ramirez, A. (2016). Alzheimer's disease risk variants modulate endophenotypes in mild cognitive impairment. *Alzheimer's & Dementia*, 12(8), 872–881.
- Lu, B., Pang, P. T., & Woo, N. H. (2005). The ying and yang of neurotrophin action. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(8), 603–604.
- Luck, T., Then, F. S., Lupp, M., Schroeter, M. L., Arélin, K., Burkhardt, R., ... Riedel-Heller, S. G. (2014). Association of the apolipoprotein E genotype with memory performance and executive functioning in cognitively intact elderly. *Neuropsychology*, 29, 382–387.
- Lupton, M., Strike, L., Hansell, N., Wen, W., Mather, K., Armstrong, N., ... Wright, M. (2016). The effect of increased genetic risk for Alzheimer's disease on hippocampal and amygdala volume. *Neurobiology of Aging*, 40, 68–77.
- Maestú, F., Baykova, E., Ruiz, J. M., Montejo, P., Montenegro, M., Llanero, M., ... Nevado, A. (2011). Increased biomagnetic activity in healthy elderly with subjective memory complaints. *Clinical Neurophysiology*, 123(3), 499–505.
- Maestú F., Ríos M., Cabestrero, R. (2008). *Neuroimagen. Técnicas y procesos cognitivos*. Barcelona: Masson.
- Mahley, R. W. (1988) Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240, 622–630.
- Mahley, R. W. (2016). Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *Journal of Molecular Medicine*, 94(7), 739–746.

- Mahley, R. W., & Rall, S. C. Jr. (2000). Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1(1), 507–537.
- Mantini, D., Perrucci, M. G., Del Gratta, C., Romani, G. L., & Corbetta, M. (2007). Electrophysiological signatures of resting state networks in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 13170–13175.
- Marden, J., Mayeda, E., Walter, S., Vivot, A., Tchetgen, E., Kawachi, I., & Glymour, M. (2016). Using an Alzheimer disease polygenic risk score to predict memory decline in black and white Americans over 14 years of follow-up. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 30(3), 195–202.
- Marosi, K., & Mattson, M. P. (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 25(2), 89–98. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2013.10.006>
- Martin, M., Clare, L., Altgassen, A. M., Cameron, M. H. & Zehnder, F. (2011). Cognition-based interventions for healthy older people and people with mild cognitive impairment. *The Cochrane database of systematic reviews*, 19(1), CD006220.
- Martínez-Ballesteros, M., García-Heredia, J., Nepomuceno-Chamorro, I., & Riquelme-Santos, J. (2017). Machine learning techniques to discover genes with potential prognosis role in Alzheimer's disease using different biological sources. *Information Fusion*, 36, 114–129.
- Masters, C., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C., Sperling, R., & Cummings, J. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15056.
- Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P., & Rogers, J. (2011). Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 32(7), 1161–1180.
- Mattson, M. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000), 631–639.
- Mattson, M. P., & Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4), 278–294. <http://doi.org/10.1038/nrn1886>

- Mattson, M. P., Maudsley, S., & Martin, B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*, 27(10), 589–594. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.001>
- Matyi, J., Tschanz, J. T., Rattinger, G. B., Sanders, C., Vernon, E. K., Corcoran, C., ... Buhusi, M. (2017). Sex Differences in Risk for Alzheimer's Disease Related to Neurotrophin Gene Polymorphisms: The Cache County Memory Study. *The Journals of Gerontology: Series A*, 72(12), 1607–1613. <http://doi.org/10.1093/gerona/glx092>
- Mayeux, R., Small, S. A., Tang, M., Tycko, B. & Stern, Y. (2001). Memory performance in healthy elderly without Alzheimer's disease: Effects of time and apolipoprotein-E. *Neurobiology of Aging*, 22, 683–689.
- McGuiness, B., Carson, R., Barret, S., Craig, D., & Passmore, P. (2010). Apolipoprotein epsilon4 and neuropsychological performance in Alzheimer's disease vascular dementia. *Neuroscience Letters*, 483(1), 62–66.
- McKhann, G., Knopman, D., Chertkow, H., Hyman, B., Jack, C., Kawas, C., ... Phelps, C. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 263–269.
- Mendiola-Precoma, J., Berumen, L., Padilla, K., & Garcia-Alcocer, G. (2016). Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2016, 1–17.
- Metzner, C., Schweikard, A., & Zurowski, B. (2016). Multifactorial Modeling of Impairment of Evoked Gamma Range Oscillations in Schizophrenia. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 10, 89. <http://doi.org/10.3389/fncom.2016.00089>
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), 850–860.
- Miyashita, A., Koike, A., Jun, G., Wang, L. S., Takahashi, S., Matsubara, E., ... Kuwano, R. (2013). SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PloS One*, 8(4), e58618. doi: 10.1371/journal.pone.0058618

- Mondadori, C. R. A., de Quervain, D. J. F., Buchmann, A., Mustovic, H., Wollmer, M. A., Schmidt, C. F., ... Henke, K. (2007). Better memory and neural efficiency in young apolipoprotein E epsilon4 carriers. *Cerebral Cortex*, 17, 1934–1947.
- Montejo, P. & Montenegro, M. (2006). Memoria cotidiana en los mayores [Everyday memory in the elderly]. Madrid, Portal Mayores, *Informes Portal Mayores*, nº 60. Lecciones de Gerontología, VIII, <http://www.immersomayores.csic.es/documentos/documentos/montejo-memoria-01.pdf>, Posted 19 September 2006, Accessed May 25, 2016.
- Montejo, P., Montenegro, M., Reinoso, A. I., De Andrés, M. E. & Claver, M. D. (2013). El método UMAM de entrenamiento de Memoria [The UMAM Memory training method], Centro de Prevención del Deterioro Cognitivo, *Madrid Salud, Ayuntamiento de Madrid*.
- Moreno-Grau, S., Hernández, I., Heilmann-Heimbach, S., Ruiz, S., Rosende-Roca, M., Mauleón, A., ... Ruiz, A. (2018). Genome-wide significant risk factors on chromosome 19 and the APOE locus. *Oncotarget*, 9(37), 24590–24600.
- Morgan, K. (2011). The three new pathways leading to Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(4), 353–357.
- Morgan, K., & Carrasquillo, M. M. (2013). *Genetic variants in Alzheimer's disease*. Springer New York. DOI: 10.1007/978-1-4614-7309-1.
- Mormann, F., Lehnertz, K., David, P., & Elger, C. (2000). Mean phase coherence as a measure for phase synchronization and its application to the EEG of epilepsy patients. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 144(3-4), 358–369.
- Mormino, E., Sperling, R., Holmes, A., Buckner, R., De Jager, P., Smoller, J., ... Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, F. (2016). Polygenic risk of Alzheimer disease is associated with early- and late-life processes. *Neurology*, 87(5), 481–488.
- Morrison, A. B. & Chein, J. M. (2011). Does working memory training work? The promise and challenges of enhancing cognition by training working memory. *Psychonomic Bulletin & Review*, 18, 46–60.
- Munoz, K. E., Hye, L. W., & Hariri, A. R. (2010). Imaging genetics. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 48(4), 356–361.

- Myers, R., Schaefer, E., Wilson, P., D'Agostino, R., Ordovas, J., Espino, A., ... Wolf, P. (1996). Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study. *Neurology*, 46(3), 673–677.
- Naj, A., Jun, G., Beecham, G., Wang, L.-S., Vardarajan, B., Buross, J., ... Schellenberg, G. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 436–441.
- Nakamura, A., Cuesta, P., Kato, T., Arahata, Y., Iwata, K., Yamagishi, M., ... Ito, K. (2017). Early functional network alterations in asymptomatic elders at risk for Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7(1). <http://doi.org/10.1038/s41598-017-06876-8>
- Nelson, L., & Tabet, N. (2015). Slowing the progression of Alzheimer's disease; what works? *Ageing Research Reviews*, 23(Pt B), 193–209.
- Neu, S., Pa, J., Kukull, W., Beekly, D., Kuzma, A., Gangadharan, P., ... Toga, A. (2017). Apolipoprotein E genotype and sex risk factors for Alzheimer disease: A meta-analysis. *JAMA Neurology*, 74(10), 1178–1189.
- Ngandu, T., Lehtisalo, J., Solomon, A., Levälahti, E., Ahtiluoto, S., Antikainen, R., ... Kivipelto, M. (2015). A 2-year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): A randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 385, 2255–2263.
- Nilsson, L. G., Adolfsson, R., Bäckman, L., Cruts, M., Nyberg, L., Small, B. J., ... Van Broeckoven, C. (2006). The influence of APOE status on episodic and semantic memory: Data from a population-based study. *Neuropsychology*, 20, 645–657.
- Niso-Galán, J. G. (2013). *Functional and effective connectivity in MEG: Application to the study of epilepsy* (PhD Thesis). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Niso, J., Bajo, R., Castellanos, P., & Pereda, E. (2015). Estudio de la conectividad funcional y efectiva en EEG/MEG. En F. Maestú (Ed.), *Conectividad Funcional y Anatómica en el Cerebro Humano* (pp. 39–49). Madrid: Elsevier.

- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis [Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis]. *Revista de Neurología*, 32(8), 523–532.
- Notaras, M., & Hill, R. A. (2015). The BDNF gene Val66Met polymorphism as a modifier of psychiatric disorder susceptibility: Progress and controversy The BDNF gene Val66Met polymorphism as a modi fi er of psychiatric disorder susceptibility : progress and controversy, (April), 1–15. <http://doi.org/10.1038/mp.2015.27>
- Novoa, A. M., Juárez, O. & Nebot, M. (2008). Review of the effectiveness of cognitive interventions in preventing cognitive deterioration in healthy elderly individuals. *Gaceta Sanitaria*, 22, 474–482.
- Nuutinen, T., Suuronen, T., Kauppinen, A., & Salminen, A. (2009). Clusterin: A forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, 61(2), 89–104.
- Ollari, J. A. (1997). Envejecimiento y función cognitiva. De la declinación al deterioro. En: C. A. Mangone, R. F. Allegri y cols., *Demencia: enfoque multidisciplinario*. Buenos Aires: Sagitario editores.
- Oostenveld, R., Fries, P., Maris, E., & Schoffelen, J. M. (2011). FieldTrip: Open source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2011, 156869. <http://doi.org/10.1155/2011/156869>.
- Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos, OECD (2015). *Addressing Dementia: The OECD Response*, *OECD Health Policy Studies*, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264231726-en>
- Orr, N. & Chanock, S. (2008). Common Genetic Variation and Human Disease. En J. C. Hall. (Ed.), *Advances in Genetics*, Volume 62 (pp. 1–32). USA: Elsevier.
- Palva, S., & Palva, J. (2007). New vistas for α -frequency band oscillations. *Trends in Neurosciences*, 30(4), 150–158.

- Pallarés, V., Insabato, A., Sanjuán, A., Kühn, S., Mantini, D., Deco, G., & Gilson, M. (2018). Extracting orthogonal subject- and condition-specific signatures from fMRI data using whole-brain effective connectivity. *NeuroImage*, 178, 238–254.
- Papenberg, G., Salami, A., Persson, J., Lindenberger, U., & Bäckman, L. (2015). Genetics and Functional Imaging: Effects of APOE, BDNF, COMT, and KIBRA in Aging. *Neuropsychology Review*, 25(1), 47–62. <http://doi.org/10.1007/s11065-015-9279-8>
- Papp, K., Walsh, S., & Snyder, P. (2009). Immediate and delayed effects of cognitive interventions in healthy elderly: a review of current literature and future directions. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 5(1), 50–60.
- Patel, N. S., Paris, D., Mathura, V., Quadros, A. N., Crawford, F. C., & Mullan, M. J. (2005). Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 2, 9. doi:10.1186/1742-2094-2-9.
- Paulson, H. L. & Igo, I. (2011). Genetics of dementia. *Seminars in Neurology*, 31, 449–460.
- Pelvig, D., Pakkenberg, H., Stark, A., & Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging*, 29(11), 1754–1762.
- Petersen, R. (2004). Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of Internal Medicine*, 256(3), 183–194.
- Petersen, R. C., Caracciolo, B., Brayne, C., Gauthier, S., Jelic, V., Fratiglioni, L. (2014). Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *Journal of internal medicine*, 275, 214–228. 10.1111/joim.12190
- Pfurtscheller, G., Stancák, A., & Neuper, C. (1996). Event-related synchronization (ERS) in the alpha band — an electrophysiological correlate of cortical idling: A review. *International Journal of Psychophysiology*, 24(1-2), 39–46.
- Pievani, M., de Haan, W., Wu, T., Seeley, W., & Frisoni, G. (2011). Functional network disruption in the degenerative dementias. *The Lancet Neurology*, 10(9), 829–843.

- Pievani, M., Filippini, N., van den Heuvel, M. P., Cappa, S. F., & Frisoni, G. B. (2014). Brain connectivity in neurodegenerative diseases—from phenotype to proteinopathy. *Nature Publishing Group*, 10(11), 1–14. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.178>
- Pievani, M., Galluzzi, S., Thompson, P. M., Rasser, P. E., Bonetti, M. & Frisoni, G. B. (2011b). APOE4 is associated with greater atrophy of the hippocampal formation in Alzheimer’s disease. *Neuroimage*, 55, 909–919.
- Pimenova, A., Raj, T., & Goate, A. (2018). Untangling Genetic Risk for Alzheimer’s Disease. *Biological Psychiatry*, 83(4), 300–310.
- Polito, L., Abbondanza, S., Vaccaro, R., Valle, E., Davin, A., Degrate, A., ... Guaita, A. (2015). Cognitive stimulation in cognitively impaired individuals and cognitively healthy individuals with a family history of dementia: Short-term results from the “Allena-Mente” randomized controlled trial. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 30, 631–638.
- Ponomareva, N. V., Andreeva, T. V., Protasova, M. S., Shagam, L. I., Malina, D. D., Goltsov, A. Y., ... Rogaev, E. (2017). Quantitative EEG during normal aging: association with the Alzheimer’s disease genetic risk variant in PICALM gene. *Neurobiology of aging*, 51, 177.e1-177.e8.
- Pottier, C., Hannequin, D., Coutant, S., Rovelet-Lecrux, A., Wallon, D., Rousseau, S., ... Campion, D. (2012). High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. *Molecular Psychiatry*, 17(9), 875–879.
- Praetorius, M., Thorvaldsson, V., Hassing, L. B., Johansson, B. (2013). Substantial effects of apolipoprotein E ϵ 4 on memory decline in very old age: Longitudinal findings from a population-based sample. *Neurobiology of Aging*, 34, 2734–2739.
- Proal, E., Alvarez-Segura, M., de la Iglesia-Vayá, M., Martí-Bonmatí, L., Castellanos, F., & Spanish Resting State Network. (2011). [Functional cerebral activity in a state of rest: connectivity networks]. *Revista de neurologia*, 52 Suppl 1(0 1), S3–10.

- Purcell, S., Wray, N., Stone, J., Visscher, P., O'Donovan, M., Sullivan, P., ... Sklar, P. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*, 460(7256), 748–752.
- Qin, X. Y., Cao, C., Cawley, N. X., Liu, T. T., Yuan, J., Loh, Y. P., & Cheng, Y. (2017). Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease: a meta-analysis study (N=7277). *Molecular Psychiatry*, 22(2), 312–320. <http://doi.org/10.1038/mp.2016.62>
- Rabl, U., Meyer, B. M., Diers, K., Bartova, L., Berger, A., Mandorfer, D., ... Pezawas, L. (2014). Additive gene-environment effects on hippocampal structure in healthy humans. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(30), 9917–9926. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3113-13.2014>
- Rami, L., Valls-Pedret, C., Bartrés-Faz, D., Caprile, C., Solé-Padullés, C., Castellvi, M., ... Molinuevo J. L. (2011). Cuestionario de Reserva Cognitiva. Valores obtenidos en población anciana sana y con enfermedad de Alzheimer [Cognitive Reserve Questionnaire. Scores obtained in a healthy elderly population and in one with Alzheimer's disease]. *Revista de neurología*, 52, 195–201.
- Ransohoff, R. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 353(6301), 777–783.
- Ramón y Cajal, S. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm.*, 1, 1–10.
- Raz, N., Rodrigue, K. M., Kennedy, K. M. & Land, S. (2009). Genetic and vascular modifiers of age-sensitive cognitive skills: Effects of COMT, BDNF, ApoE, and hypertension. *Neuropsychology*, 23, 105–116.
- Reitan, R. M. (1958). Validity of the Trail Making Test as an Indicator of Organic Brain Damage. *Perceptual and Motor Skills*, 8, 271–276.
- Reuter-Lorenz, P. A. & Cappell, K. A. (2008). Neurocognitive aging and the compensation hypothesis. *Current Directions in Psychological Science*. 17(3), 177–182.

- Ridge, P., Hoyt, K., Boehme, K., Mukherjee, S., Crane, P., Haines, J., ... Kauwe, J. (2016). Assessment of the genetic variance of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 41, 200.e13-200.e20.
- Ridge, P., Mukherjee, S., Crane, P., Kauwe, J., & Consortium, A. (2013). Alzheimer's Disease: Analyzing the Missing Heritability. (H. Paudel, Ed.) *PLoS One*, 8(11), e79771.
- Riedel, B. C., Thompson, P. M., & Brinton, R. D. (2016). Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160, 134–147.
- Risch, N. (2000). Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405(6788), 847–856.
- Ritchie, K., & Lovestone, S. (2002). The dementias. *The Lancet*, 360(9347), 1759–1766.
- Redick, T. S., Shipstead, Z., Harrison, T. L., Hicks, K.L., Fried, D. E., Hambrick, D. Z., ... Engle, R. W. (2013). No evidence of intelligence improvement after working memory training: A randomized, placebo-controlled study. *Journal of Experimental Psychology*, 142, 359–579.
- Robinson, F. P. (1970). *Effective Study*, Ed. Harper & Row, New York.
- Robinson, M., Lee, B. Y., & Hane, F. T. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(2), 317–330.
- Roche, R., & Commins, S. (2009). *Pioneering studies in cognitive neuroscience*. Open University Press.
- Rodríguez-Rodríguez, E., Sánchez-Juan, P., Vázquez-Higuera, J., Mateo, I., Pozueta, A., Berciano, J., ... Combarros, O. (2013). Genetic risk score predicting accelerated progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 120(5), 807–812.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., ... St George-Hyslop, P. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genetics*, 39(2), 168–177.

- Roses, A., Lutz, M., Amrine-Madsen, H., Saunders, A., Crenshaw, D., Sundseth, S., ... Reiman, E. (2010). A TOMM40 variable-length polymorphism predicts the age of late-onset Alzheimer's disease. *The Pharmacogenomics Journal*, 10(5), 375–384.
- Rothman, S. M., & Mattson, M. P. (2013). Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. *Neuroscience*, 239, 228–240. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.014>
- Roussotte, F., Gutman, B., Madsen, S., Colby, J., Thompson, P., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, f. (2014). Combined effects of Alzheimer risk variants in the CLU and ApoE genes on ventricular expansion patterns in the elderly. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(19), 6537–6545.
- Sabuncu, M., Buckner, R., Smoller, J., Lee, P., Fischl, B., & Sperling, R. (2012). The association between a polygenic Alzheimer score and cortical thickness in clinically normal subjects. *Cerebral Cortex*, 22(11), 2653–2661.
- Sala-Llonch, R., Bartrés-Faz, D., & Junqué, C. (2015). Reorganization of brain networks in aging: a review of functional connectivity studies. *Frontiers in Psychology*, 6, 663.
- Salminen, T., Strobach, T. & Schubert, T. (2012). On the impacts of working memory training on executive functioning. *Frontiers in Human Neuroscience*, 6, 166.
- Sauseng, P., & Klimesch, W. (2008). What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(5), 1001–1013.
- Schjeide, B. M., Schnack, C., Lambert, J. C., Lill, C., Kirchheiner, J., Tuman, H., ... Bertram, L. (2011). The Role of Clusterin, Complement Receptor 1, and Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein in Alzheimer Disease Risk and Cerebrospinal Fluid Biomarker Levels. *Archives of General Psychiatry*, 68(2), 207–213.
- Schofield, P. R., Williams, L. M., Paul, R. H., Gatt, J. M., Brown, K., Luty, A., ... Gordon, E. (2009). Disturbances in selective information processing associated with the BDNF Val66Met polymorphism: Evidence from cognition, the P300 and fronto-hippocampal systems. *Biological Psychology*, 80(2009), 176–188. <http://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2008.09.001>

- Seeley, W., Crawford, R., Zhou, J., Miller, B., & Greicius, M. (2009). Neurodegenerative Diseases Target Large-Scale Human Brain Networks. *Neuron*, 62(1), 42–52.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A., Ikram, M., DeStefano, A., Gudnason, V., Boada, M., ... EADI1 Consortium. (2010). Genome-wide Analysis of Genetic Loci Associated With Alzheimer Disease. *JAMA*, 303(18), 1832.
- Shao, W., Peng, D., & Wang, X. (2017). Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *Journal of Clinical Neuroscience*, 45, 1–8.
- Sheikh, J. L. & Yesavage, J. A. (1986). Geriatric Depression Scale (GDS): Recent evidence and development of a shorter version. *Clinical gerontologist*, 5, 165–173.
- Shipstead, Z., Redick, T. S. & Engle, R. W. (2010). Does working memory training generalize? *Psychologica Belgica*, 50, 245–276.
- Singhrao, S., Neal, J., Rushmere, N., Morgan, B., & Gasque, P. (1999). Differential expression of individual complement regulators in the brain and choroid plexus. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(10), 1247–1259.
- Sklar, P., Ripke, S., Scott, L., Andreassen, O., Cichon, S., ... Purcell, S. (2011). Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature Genetics*, 43(10), 977–983.
- Slegers, K., Bettens, K., De Roeck, A., Van Cauwenberghe, C., Cuyvers, E., Verheijen, J., ... Van Broeckhoven, C. (2015). A 22-single nucleotide polymorphism Alzheimer's disease risk score correlates with family history, onset age, and cerebrospinal fluid A β 42. *Alzheimer's and Dementia*, 11(12), 1452–1460.
- Small, B. J., Rosnick, C. B., Fratiglioni, L. & Bäckman, L. (2004). Apolipoprotein E and cognitive performance: A meta-analysis. *Psychology and Aging*, 19, 592–600.
- Smits, L.L., Pijnenburg, Y. A. L., Van der Vlies, A. E., Koedam, E. L. G. E., Bouwman, F. H., Reuling, I. E. W., ... Van der Flier, W. M. (2015). Early onset APOE E4-negative Alzheimer's disease patients show faster cognitive decline on non-memory domains. *European Neuropsychopharmacology*, 25, 1–8.

- Sobhanifar, S. Schneider, B., Löhr, F., Gottstein D., Ikeya, T., Mlynarczyk, K., ... Dötscha, V. (2010). Biophysics and Computational Biology Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21): 9644–9649.
- Sohrabji, F., & Lewis, D. K. (2006). Estrogen–BDNF interactions: Implications for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27(4), 404–414. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.09.003>
- Song, F. Han, G., Bai, Z., Peng, X., Wang, J., & Lei, H. (2015). Alzheimer’s Disease: Genomics and Beyond. *International review of neurobiology*, 121, 1–24.
- Sorg, C., Riedl, V., Muhlau, M., Calhoun, V. D., Eichele, T., Laer, L., ... Wohlschläger, A. M. (2007). Selective changes of resting-state networks in individuals at risk for Alzheimer’s disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18760–18765.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(3), 206–221.
- Stam, C. J. (2010). Use of magnetoencephalography (MEG) to study functional brain networks in neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, 289(1–2), 128–134. <http://doi.org/10.1016/j.jns.2009.08.028>
- Stam, C. J. (2014). Modern network science of neurological disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 683–695. <http://doi.org/10.1038/nrn3801>
- Stam, C. J., van Cappellen van Walsum, A. M., Pijnenburg, Y. A. L., Berendse, H. W., de Munck, J. C., Scheltens, P., & van Dijk, B. W. (2002). Generalized synchronization of MEG recordings in Alzheimer’s Disease: evidence for involvement of the gamma band. *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society*, 19(6), 562–574.
- Stam, C., & van Dijk, B. (2002). Synchronization likelihood: an unbiased measure of generalized synchronization in multivariate data sets. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 163(3–4), 236–251.

- Stening, E., Persson, J., Eriksson, E., Wahlund, L., Zetterberg, H. & Söderlund, H. (2016). Apolipoprotein E ϵ 4 is positively related to spatial performance but unrelated to hippocampal volume in healthy young adults. *Behavioural Brain Research*, 299, 11–18.
- Stern, E., Bacsikai, B., Hickey, G., Attenello, F., Lombardo, J., & Hyman, B. (2004). Cortical Synaptic Integration In Vivo Is Disrupted by Amyloid- Plaques. *Journal of Neuroscience*, 24(19), 4535–4540.
- Stern, Y. (2012). Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, 11(11), 1006–1012.
- Stevens, B., DiBattista, A., William Rebeck, G., & Green, A. (2014). A gene–brain–cognition pathway for the effect of an Alzheimer's risk gene on working memory in young adults. *Neuropsychologia*, 61, 143–149.
- Suri, S., Heise, V., Trachtenberg, A. J. & Mackay, C. E. (2013). The forgotten APOE allele: A review of the evidence and suggested mechanisms for the protective effect of APOE ϵ 2. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37, 2878–2886.
- Tai, L. M., Thomas, R., Marottoli, F. M., Koster, K. P., Kanekiyo, T., Morris, A. W., & Bu., G. (2016). The role of APOE in cerebrovascular dysfunction. *Acta neuropathologica*, 131(5), 709–723.
- Tardif, S. & Simard, M. (2011). Cognitive stimulation programs in healthy elderly: A review. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 1–13.
- Tamura, H., Shiosaka, S., & Morikawa, S. (2017). Neurochemistry International Trophic modulation of gamma oscillations : The key role of processing protease for Neuregulin-1 and BDNF precursors. *Neurochemistry International*, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.12.002>
- Tan, L., Wang, H. F., Tan, M. S., Tan, C. C., Zhu, X. C., Miao, D., ... Yu, J. T.; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). Effect of CLU genetic variants on cerebrospinal fluid and neuroimaging markers in healthy, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease cohorts. *Scientific Reports*, 6, 26027. doi: 10.1038/srep26027.

- Tanaka, J. I., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G., & Kasai, H. (2008). Protein Synthesis and Neurotrophin-Dependent Structural Plasticity of Single Dendritic Spines. *Science*, 319(5870), 1683–1687.
- Tang, X., Holland, D., Dale, A.M. y Miller, M.I (2015). APOE affects the volume and shape of the amygdala and the hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's Disease: Age matters. *Journal of Alzheimer's Disease*, 47, 645–660.
- Taulu, S., & Simola, J. (2006). Spatiotemporal signal space separation method for rejecting nearby interference in MEG measurements. *Physics in Medicine and Biology*, 51(7), 1759–1768. <http://doi.org/10.1088/0031-9155/51/7/008>
- Tellechea, P., Pujol, N., Esteve-Belloch, P., Echeveste, B., García-Eulate, M., Arbizu, J., & Riverol, M. (2018). Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz y de inicio tardío: ¿son la misma entidad? *Neurología*, 33(4), 244–253.
- Teng, H., Teng, K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R., ... Hempstead, B. (2005). ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin. *Journal of Neuroscience*, 25(22), 5455–5463.
- Teng, K., & Hempstead, B. (2004). Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61(1), 35–48.
- Thomas, J., Brier, M., Bateman, R., Snyder, A., Benzinger, T., Xiong, C., ... Ances, B. (2014). Functional Connectivity in Autosomal Dominant and Late-Onset Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 71(9), 1111.
- Tononi, G., Sporns, O., & Edelman, G. (1994). A measure for brain complexity: Relating functional segregation and integration in the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 5033–5037.
- Tosto, G., Bird, T., Tsuang, D., Bennett, D., Boeve, B., Cruchaga, C., ... Mayeux, R. (2017). Polygenic risk scores in familial Alzheimer disease. *Neurology*, 88(12), 1180–1186.
- Tzourio-Mazoyer, N., Landeau, B., Papathanassiou, D., Crivello, F., Etard, O., Delcroix, N., ... Joliot, M. (2002). Automated anatomical labeling of activations in SPM using a

- macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *NeuroImage*, 15(1), 273–289. <http://doi.org/10.1006/nimg.2001.0978>
- Uegaki, K., Kumanogoh, H., Mizui, T., & Hirokawa, T. (2017). BDNF Binds Its Pro-Peptide with High Affinity and the Common Val66Met Polymorphism Attenuates the Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), pii: E1042. <http://doi.org/10.3390/ijms18051042>
- Van der Flier, W., Pijnenburg, Y., Fox, N., & Scheltens, P. (2011). Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ϵ 4 allele. *The Lancet Neurology*, 10(3), 280–288.
- Van Veen, B. D., van Drongelen, W., Yuchtman, M., & Suzuki, A. (1997). Localization of brain electrical activity via linearly constrained minimum variance spatial filtering. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 44(9), 867–880. <http://doi.org/10.1109/10.623056>
- Varela, F., Lachaux, J., Rodriguez, E., & Martinerie, J. (2001). The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2, 229–239. doi:10.1038/35067550.
- Verhaaren, B., Vernooij, M., Koudstaal, P., Uitterlinden, A., van Duijn, C., Hofman, A., ... Ikram, M. (2013). Alzheimer's Disease Genes and Cognition in the Nondemented General Population. *Biological Psychiatry*, 73(5), 429–434.
- Voineskos, A. N., Lerch, J. P., Felsky, D., Shaikh, S., Rajji, T. K., Miranda, D., ... Kennedy, J. L. (2011). The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and prediction of neural risk for Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry*, 68(2), 198–206. <http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.194>
- Vos, S., Xiong, C., Visser, P., Jasielec, M., Hassenstab, J., Grant, E., ... Fagan, A. (2013). Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. *The Lancet Neurology*, 12(10), 957–965.
- Walhovd, K., Fjell, A., & Espeseth, T. (2014). Cognitive decline and brain pathology in aging - need for a dimensional, lifespan and systems vulnerability view. *Scandinavian Journal of Psychology*, 55(3), 244–254.

- Walsh, C., Drinkenburg, W., & Ahnaou, A. (2017). Neurophysiological assessment of neural network plasticity and connectivity: Progress towards early functional biomarkers for disease interception therapies in Alzheimer's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 73, 340–358.
- Wang, J., Fang, Y., Wang, X., Yang, H., & Yu, X. (2017). Enhanced Gamma Activity and Cross-Frequency Interaction of Electroencephalographic Oscillations in Patients with Alzheimer's Disease, 9, 1–7. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00243>
- Wang, L., Zang, Y., He, Y., Liang, M., Zhang, X., Tian, L., ... Li, K. (2006). Changes in hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's disease: Evidence from resting state fMRI. *NeuroImage*, 31(2), 496–504.
- Ward, D. D., Andel, R., Saunders, N. L., Thow, M. E., Klekociuk, S. Z., Bindoff, A. D., & Vickers, J. C. (2017). The BDNF Val66Met polymorphism moderates the effect of cognitive reserve on 36-month cognitive change in healthy older adults. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(3), 323–331. <http://doi.org/10.1016/J.TRCI.2017.04.006>
- Wattmo, C., Londos, E., & Minthon, L. (2014). Risk Factors That Affect Life Expectancy in Alzheimer's Disease: A 15-Year Follow-Up. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 38(5-6), 286–299.
- Wechsler, D. (2004). WMS-III. Escala de memoria de Wechsler-III: manual de aplicación y puntuación [Wechsler Memory Scale-III: Application and scoring manual], TEA (Orig. 1997), Madrid.
- Wei, S. M., Eisenberg, D. P., Kohn, P. D., Kippenhan, J. S., Kolachana, B. S., Weinberger, D. R., & Berman, K. F. (2012). Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism Affects Resting Regional Cerebral Blood Flow and Functional Connectivity Differentially in Women Versus Men. *Journal of Neuroscience*, 32(20), 7074–7081. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5375-11.2012>
- Williams, G. C. (1957). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution*, 11(4), 398. <http://doi.org/10.2307/2406060>

- Willis, S. L., & Caskie, G. I. L. (2013). Reasoning Training in the ACTIVE Study: How Much is Needed and Who Benefits? *Journal of Aging and Health*, 25(8 0), 10.1177/0898264313503987. <http://doi.org/10.1177/0898264313503987>
- Wilson, R. S., Schneider, J. A., Barnes, L. L., Beckett, L. A., Aggarwal, N. T., Cochran, E. J., ... Bennett, D. A. (2002). The apolipoprotein E epsilon 4 allele and decline in different cognitive systems during a 6-year period. *Archives of neurology*, 59, 1154–1160.
- Wisdom, N. M., Callahan, J. L. & Hawkins, K. A. (2011). The effects of apolipoprotein E on non-impaired cognitive functioning: A meta-analysis. *Neurobiology of Aging*, 32, 63–74.
- Wollam, M., Weinstein, A., Saxton, J., Morrow, L., Snitz, B., Fowler, N., ... Erickson, K. (2015). Genetic Risk Score Predicts Late-Life Cognitive Impairment. *Journal of Aging Research*, 2015, 1–8.
- Wu, X., Li, R., Fleisher, A., Reiman, E., Guan, X., Zhang, Y., ... Yao, L. (2011). Altered default mode network connectivity in alzheimer's disease-A resting functional MRI and bayesian network study. *Human Brain Mapping*, 32(11), 1868–1881.
- Xiao, E., Chen, Q., Goldman, A., Tan, H., Healy, K., Zoltick, B., ... Mattay, V. (2017). Late-Onset Alzheimer's Disease Polygenic Risk Profile Score Predicts Hippocampal Function. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 2(8), 673–679.
- Xiao, Q., Gil, S. C., Yan, P., Wang, Y., Han, S., Gonzales, E., ... Lee, J. M. (2012). Role of Phosphatidylinositol Clathrin Assembly Lymphoid-Myeloid Leukemia (PICALM) in Intracellular Amyloid Precursor Protein (APP) Processing and Amyloid Plaque Pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 21279–21289.
- Yankner, B., Lu, T., & Loerch, P. (2008). The Aging Brain. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3(1), 41–66.
- Zalesky, A., Fornito, A., & Bullmore, E. (2010). Network-based statistic: Identifying differences in brain networks. *NeuroImage*, 53(4), 1197–1207.

- Zdanys, K. F., Kleiman, T. G., Zhang, H., Ozbay, F., MacAvoy, M. G., Gelernter, J., & Van Dyck, C. H. (2009). BDNF variants, premorbid educational attainment, and disease characteristics in alzheimer's disease: An exploratory study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17, 887–898. <http://doi.org/10.3233/JAD-2009-1106>
- Zehnder, A. E., Bläsi, S., Berres, M., Monsch, A. U., Stähelin, H. B. y Spiegel, R. (2009). Impact of APOE status on cognitive maintenance in healthy elderly persons. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 24, 132–141.
- Zhang, H. T., Li, L. Y., Zou, X. L., Song, X. B., Hu, Y. L., Feng, Z. T., & Wang, T. T. H. (2007). Immunohistochemical Distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in Adult Rhesus Monkey Brains. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(1), 1–19. <http://doi.org/10.1369/jhc.6A6952.2006>
- Zhang, D., Wang, Y., Zhou, L., Yuan, H., & Shen, D. (2011). Multimodal classification of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *NeuroImage*, 55(3), 856–867.
- Zhang, P., Qin, W., Wang, D., Liu, B., Zhang, Y., Jiang, T., & Yu, C. (2015). Impacts of PICALM and CLU variants associated with Alzheimer's disease on the functional connectivity of the hippocampus in healthy young adults. *Brain Structure and Function*, 220(3), 1463–1475.
- Zheng, K., An, J. J., Yang, F., Xu, W., Xu, Z.-Q. D., Wu, J., ... Lu, B. (2011). TrkB signaling in parvalbumin-positive interneurons is critical for gamma-band network synchronization in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17201–17206. <http://doi.org/10.1073/pnas.1114241108>
- Ziegler, E., Foret, A., Mascetti, L., Muto, V., Bourdieu-shaffii, A. Le, & Phillips, C. (2013). Altered White Matter Architecture in BDNF Met Carriers. *PLoS One*, 8(7), e69290. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0069290>

9. APPENDIX: The UMAM Cognitive Training Program

Objectives

The main goals of the UMAM cognitive training program were to teach basic knowledge about memory and promote a greater sense of memory control in people over 65. The training was intended to stimulate cognitive processes and to develop strategies to manage daily-life memory problems. In other words, this training was a meta-memory- and cognitive stimulation-based program. From 2006 to the present, the UMAM cognitive training program has been carried out in the 16 Local Health Centers of the City of Madrid.

Participants

The UMAM cognitive training program was led by one instructor in groups of 14-16 participants each. All the instructors had a professional degree (general practitioner, psychiatrist, or neuropsychologist) and had received specific training before conducting the first session of evaluation.

Duration

The UMAM cognitive training program consisted of a total of 30 sessions, 90 minutes each. Twenty-eight of them were carried out within three months, and the last two could be considered as maintenance or booster sessions that took place within the following six months.

Procedure

For each session, instructors followed a structured format divided into two parts. Each of them had its own objectives, materials and specific activities.

The first part started with a review of previous homework, 15 minutes of relaxation, and 10 minutes more of activation. In these ten minutes, participants were randomly asked to answer some arithmetic problems aloud.

The 60-minute second part involved structured training using activity-sheets, role-playing, audio video, and the instructor's explanations. The outline of each exercise included motivation, presentation of specific goals, individual or group solution, thinking over the results, and application to daily life. The last 5 minutes were used to suggest some homework to do.

Structure

The UMAM cognitive training program was a multi-domain cognitive training which was divided into four training areas:

(1) Training area 1: Cognitive Stimulation and Learning Specific Strategies.

Cognitive processes such as attention, perception or language were stimulated by specific exercises. The most important memory strategies were intended to teach visualization, association, categorization, or information elaboration in order to remember places, texts, images and conversations.

(2) Training area 2: Memory Concepts.

The main aspects of memory functioning, especially those whose knowledge may have more impact on daily life, were presented to participants: memory categories, memory processes, memory in older people, and factors reducing memory performance.

(3) Training area 3: Management of Everyday Memory Failures.

Daily forgetfulness and complaints that upset participant's daily life were extensively treated with role-playing and exercises focused on prospective memory (remembering something to do), retrospective memory (remembering having done something, where an object had been placed or what they had been told), automatic actions (turning off the gas, leaving the key in a specific place, taking medication), remembering names, and

recall of texts. The use of external aids (agenda, alarm, telephone book, lists, labels, etc.) was also exercised.

(4) Training area 4: Meta-memory training.

As meta-memory plays a key role in memory performance, as of the first session of the UMAM cognitive training, the program stimulated awareness of memory failures and of the mechanisms each person used. Negative stereotypes about memory in older people were addressed through dialogue, and continuous messages about favorable outcomes were given when appropriate strategies or techniques were used.

Extended description

A more extended and comprehensive description of the UMAM cognitive training program can be found in Montejo, Montenegro, Reinoso, de Andrés, and Claver (2013).

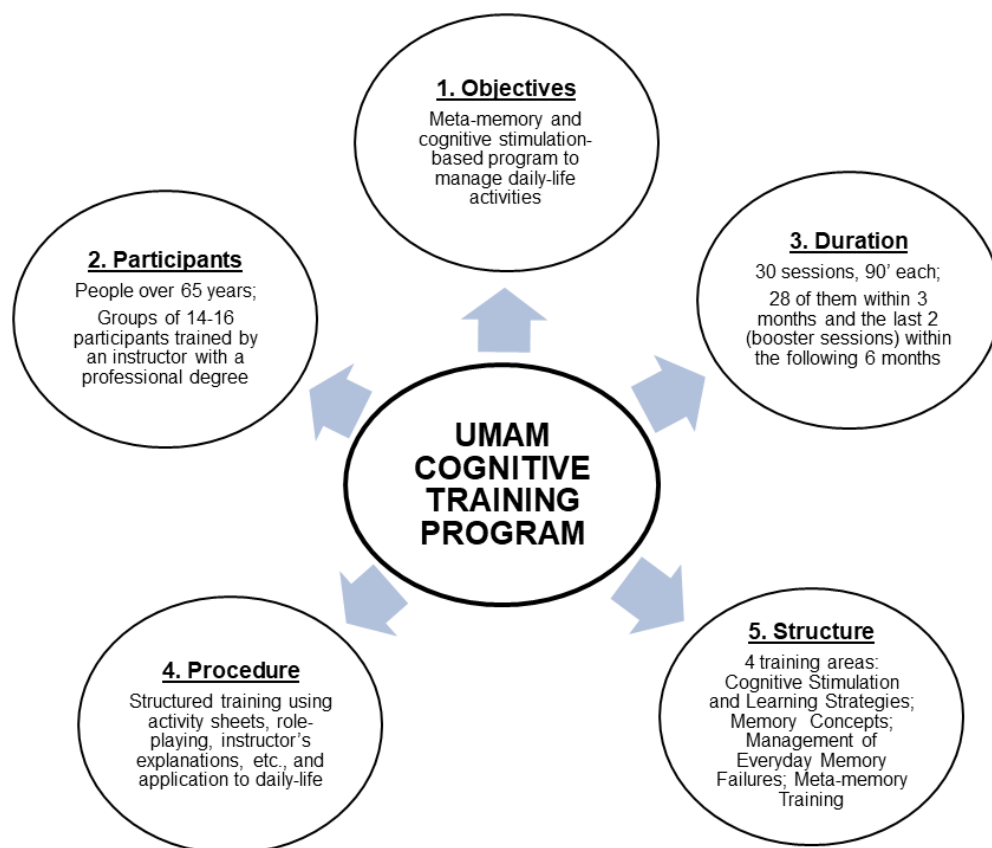


Figure 9.1. Appendix. The UMAM Cognitive Training Program.